

Aus dem Lehrstuhl für Pathologie  
Prof. Dr. med. F. Hofstädter  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Untersuchung der Promotormethylierung von CA4 als  
prädiktiver Marker beim kolorektalen Karzinom: klinische  
Statistik und Korrelation mit molekularpathologischen  
Parametern**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Simone Schuster

2012



Aus dem Lehrstuhl für Pathologie  
Prof. Dr. med. F. Hofstädter  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Untersuchung der Promotormethylierung von CA4 als  
prädiktiver Marker beim kolorektalen Karzinom: klinische  
Statistik und Korrelation mit molekularpathologischen  
Parametern**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Simone Schuster

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Dietmaier

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Pompiliu Piso

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2012

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Einleitung .....	4
1.1 Das Kolorektale Karzinom (KRK) .....	4
1.2 Therapie des KRK .....	11
1.2.1 Kolonkarzinom im lokalisierten Stadium (UICC-Stadium 1-3) ...	11
1.2.2 Rektumkarzinom im lokalisierten Stadium (UICC 1-3) .....	12
1.2.3 KRK im UICC-Stadium 4 .....	13
1.3 Epigenetik .....	13
1.4 CIMP .....	16
1.4.1 Definition von CIMP .....	16
1.4.2 CIMP-Marker .....	18
1.5 CA4 .....	19
2 Zielsetzung .....	21
3 Materialien und Methoden .....	22
3.1 Materialien und Geräte .....	22
3.1.1 Geräte .....	22
3.1.2 Chemikalien .....	22
3.1.3 Patientengut .....	23
3.1.4 CIMP-Marker .....	23
3.1.5 Kontrollen .....	23
3.1.6 Oligonukleotidsequenzen .....	23
3.2 Patientengut .....	24
3.2.1 Definition der Patientenkollektive .....	24
3.2.2 Beschreibung Ausgangskollektiv .....	24
3.2.3 Beschreibung Subgruppe im UICC-Stadium 3 .....	25
3.3 Methylierungsanalyse .....	27
3.3.1 Das Prinzip von QESD .....	27
3.3.2 Verdau .....	28
3.3.3 Quantitative PCR .....	29
3.3.4 Quantifizierung .....	32
3.4 Daten .....	33

3.4.1	Molekulare und immunhistochemische Daten .....	33
3.5	Statistische Auswertung.....	33
4	Ergebnisse .....	34
4.1	Statistische Analyse des Ausgangskollektives .....	34
4.1.1	Prätherapeutische Behandlungssituation .....	34
4.1.2	Tumorlokalisation.....	35
4.1.3	Operation .....	37
4.1.4	Histologie .....	43
4.1.5	(Neo-)adjuvante Therapie.....	46
4.1.6	CEA-Werte .....	49
4.1.7	Rezidive .....	52
4.1.8	Rezidivfreies Überleben .....	54
4.1.9	Overall Survival.....	59
4.2	Methylierungsanalyse von CA4.....	70
4.2.1	Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten.....	70
4.2.2	Korrelation mit molekularen Charakteristika .....	72
4.2.3	Korrelation mit p53-Status .....	74
4.3	Methylierungsanalyse der CIMP-Marker .....	74
4.4	Korrelation von CA4- und CIMP-Methylierung .....	77
4.5	Überlebenskurven .....	80
4.5.1	Progressionsfreies Überleben .....	80
4.5.2	Overall Survival.....	83
5	Diskussion .....	90
5.1	Statistische Analyse des Ausgangskollektives .....	90
5.1.1	Prätherapeutische Behandlungssituation .....	90
5.1.2	Tumorlokalisation.....	90
5.1.3	Operation .....	91
5.1.4	Histologie .....	92
5.1.5	(Neo-)adjuvante Therapie.....	93
5.1.6	CEA-Werte .....	95
5.1.7	Rezidive .....	96
5.1.8	Rezidivfreies Überleben .....	97
5.1.9	Overall Survival.....	98
5.2	Methylierungsanalyse von CA4.....	101

5.2.1	Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten.....	102
5.2.2	Korrelation mit molekularen Charakteristika.....	102
5.2.3	Korrelation mit p53-Status .....	105
5.3	Methylierungsanalyse der CIMP-Marker .....	106
5.4	Korrelation von CA4- und CIMP-Methylierung .....	108
5.5	Progressionsfreies und Overall Survival.....	108
6	Zusammenfassung .....	113
	Abkürzungsverzeichnis .....	118
	Abbildungsverzeichnis.....	121
	Tabellenverzeichnis.....	124
	Literaturverzeichnis.....	126
	Anhang .....	139
	Danksagung.....	146
	Erklärung.....	147

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Kolorektale Karzinom (KRK)

Beim KRK handelt es sich vor allem um ein Malignom des höheren Lebensalters und der Zivilisation. Das mittlere Erkrankungsalter liegt beim männlichen Geschlecht bei 68 Jahren und beim weiblichen Geschlecht bei 73 Jahren. Die Inzidenz variiert stark in Europa. In Deutschland herrscht eine sehr hohe Inzidenz von über 81,3 pro 100.000 Männern und 36,4 pro 100.000 Frauen vor. In Griechenland liegt die niedrigste Inzidenz mit etwas mehr als 20 Erkrankten unter 100.000 Menschen vor (1,120).

Abbildung 3.5.1

Altersspezifische Erkrankungsrate in Deutschland nach Geschlecht, für 1980, 1990 und 2006, ICD-10 C18–21  
pro 100.000

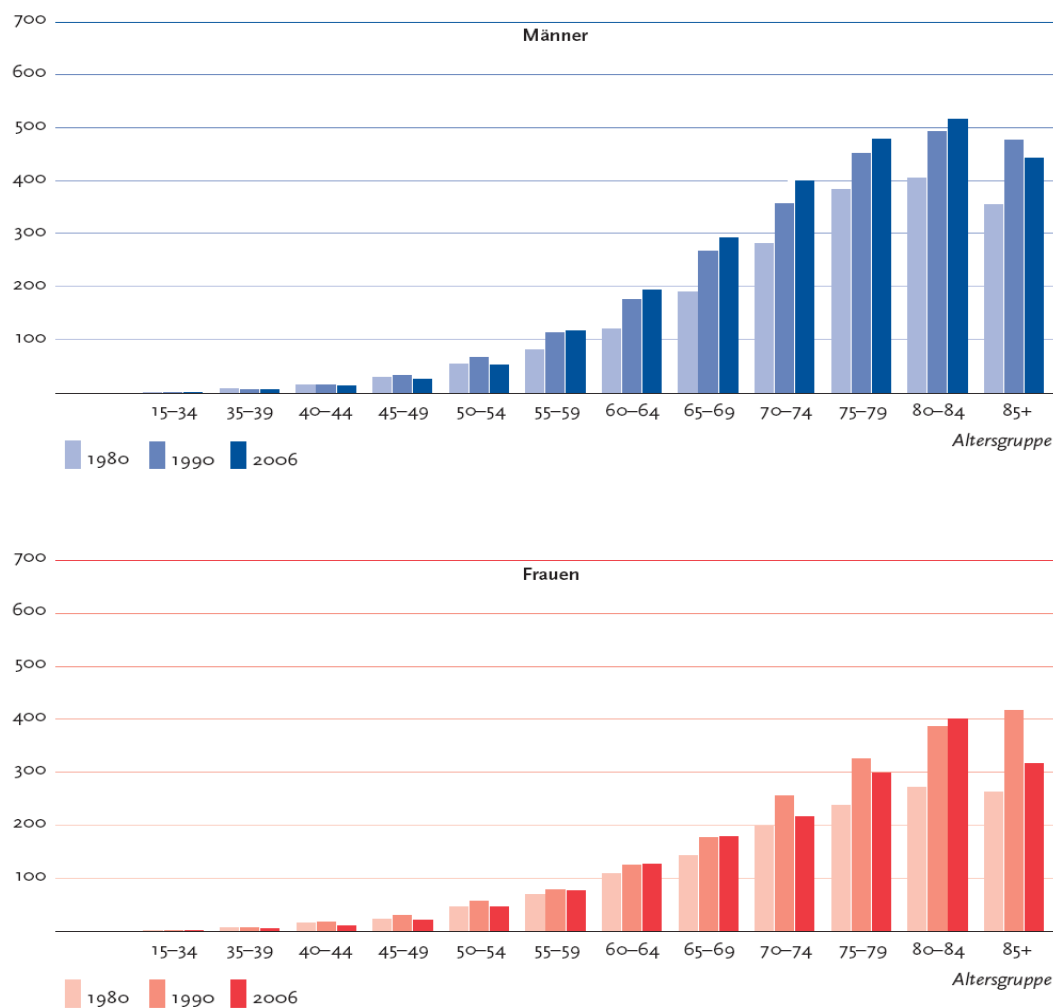
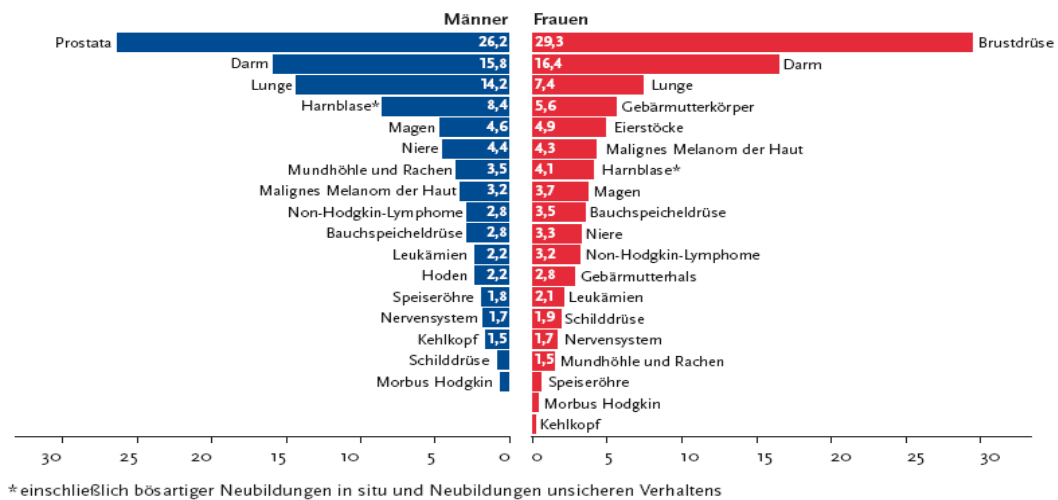


Abbildung 1: Altersverteilung von Darmkrebs in Deutschland (120)



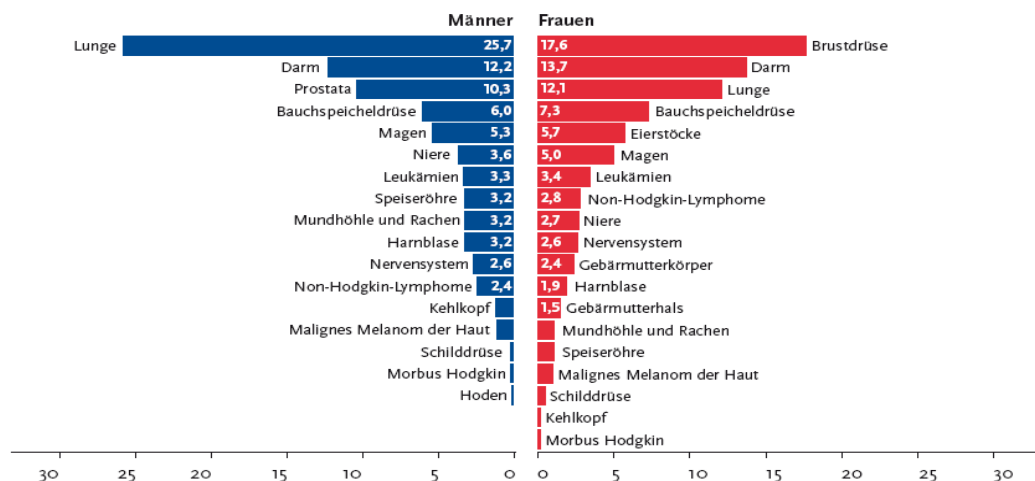
Das KRK ist mittlerweile sowohl bei Männern als auch bei Frauen die zweithäufigste Krebserkrankung und Krebstodesursache in Deutschland. Laut Statistik des Robert-Koch-Institutes (RKI) ist unter Frauen das Mammakarzinom für die meisten Krebserkrankungen und zugleich Krebstodesursachen verantwortlich. Männer hingegen erkranken am häufigsten an Prostatakarzinomen, während die höchste Krebssterblichkeit beim Bronchialkarzinom beobachtet wird (120).

**Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2006**  
Quelle: Schätzung der Dachdokumentation Krebs im Robert Koch-Institut



**Abbildung 2: Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2006 (120)**

**Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2006**  
Quelle: Amtliche Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden



**Abbildung 3: Krebssterbefälle in Deutschland 2006 (120)**

Es wird vermutet, dass ca. 90% der KRK sporadisch auftreten, während 10% durch Keimbahnmutationen bedingt sind; Übersicht in (91). Das Auftreten von synchronen kolorektalen Zweitkarzinomen beträgt ca. 4% (11).

Epidemiologische Daten legen nahe, dass die Ernährung einen großen ätiologischen Faktor in der Entstehung des KRK darstellt. Hierbei wird vor allem eine ballaststoffarme (7) und fleischreiche (rotes Fleisch) Ernährung als Risikofaktor erwähnt. Des weiteren wird auch ein erhöhter Alkoholkonsum, vor allem in Verbindung mit einer reduzierten Folsäureaufnahme als begünstigender Faktor für die Entstehung eines KRK genannt. Körperliche Inaktivität soll ein KRK begünstigen. Hier sind die Hintergründe jedoch noch nicht vollständig geklärt, da auch adipöse Menschen häufiger am KRK erkranken und Adipositas häufig in Verbindung mit verminderter körperlicher Aktivität steht (44). Außerdem wurde eine Korrelation zwischen langjährigem Zigarettenrauchen und der Entstehung kolorektaler Adenome gefunden; Übersicht in (43).

Auch die genetische Disposition hat einen Einfluss auf die Entstehung eines KRK. Das Hereditäre Nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) liegt geschätzt 4-6% aller KRK zu Grunde. Es handelt sich dabei um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung. Das Risiko für die Entwicklung eines KRK bei einem Patienten mit HNPCC beträgt über 80% (90). Ursächlich ist eine Mutation verschiedener DNA-Reparatur-Gene mit dem Auftreten von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) (27). Diese Patienten haben auch ein erhöhtes Risiko für extrakolonische Tumoren. Auffallend ist ein frühes Manifestationsalter (mittleres Erkrankungsalter ca. 45 Jahre), die häufige Ausbildung von synchronen und metachronen Zweitkarzinomen und die bevorzugte Tumorlokalisation im rechten Hemikolon (89,144). Zur Diagnosesicherung wurden die Amsterdam- und die Bethesda-Kriterien eingeführt. Wenn eines der Bethesda-Kriterien bzw. alle Amsterdam II-Kriterien erfüllt sind, sollte eine MSI-Diagnostik durchgeführt werden (139,143).

<b>Amsterdam II-Kriterien</b> (alle Kriterien müssen erfüllt sein)	<b>Überarbeitete Bethesda-Kriterien</b> (mindestens ein Kriterium muss erfüllt sein)
Mind. 3 Familienangehörige mit HNPCC-assoziertem Karzinom (Endometrium, Dünndarm, Urothel, Kolon, Rektum)	Diagnose eines KRK vor dem 50. LJ
<ul style="list-style-type: none"> <li>einer davon Verwandter ersten Grades der beiden anderen</li> </ul>	Diagnose von syn- oder metachronen kolorektalen oder anderen HNPCC-assozierten Karzinomen unabhängig vom Alter
<ul style="list-style-type: none"> <li>Erkrankungen in mind. zwei aufeinander folgenden Generationen</li> </ul>	Diagnose eines KRK vor dem 60 LJ mit typischer Histologie eines MSI-H-Tumors (tumorinfiltrierende Lymphozyten, Crohn's like lesions, muzinöse oder siegelringzellige Differenzierung, medulläres Karzinom)
<ul style="list-style-type: none"> <li>mind. ein Patient mit der Diagnose eines Karzinoms vor dem 50. LJ (FAP ausgeschlossen)</li> </ul>	Diagnose eines KRK bei mind. einem erstgradig Verwandten mit einem HNPCC-assozierten Tumor, davon Diagnose eines Tumors vor dem 50. LJ
	Diagnose eines KRK bei zwei oder mehr erstgradigen Verwandten mit einem HNPCC-assozierten Tumor, unabhängig vom Alter

**Tabelle 1-1: Amsterdam II-Kriterien und überarbeitete Bethesda-Kriterien (139,142,143)**

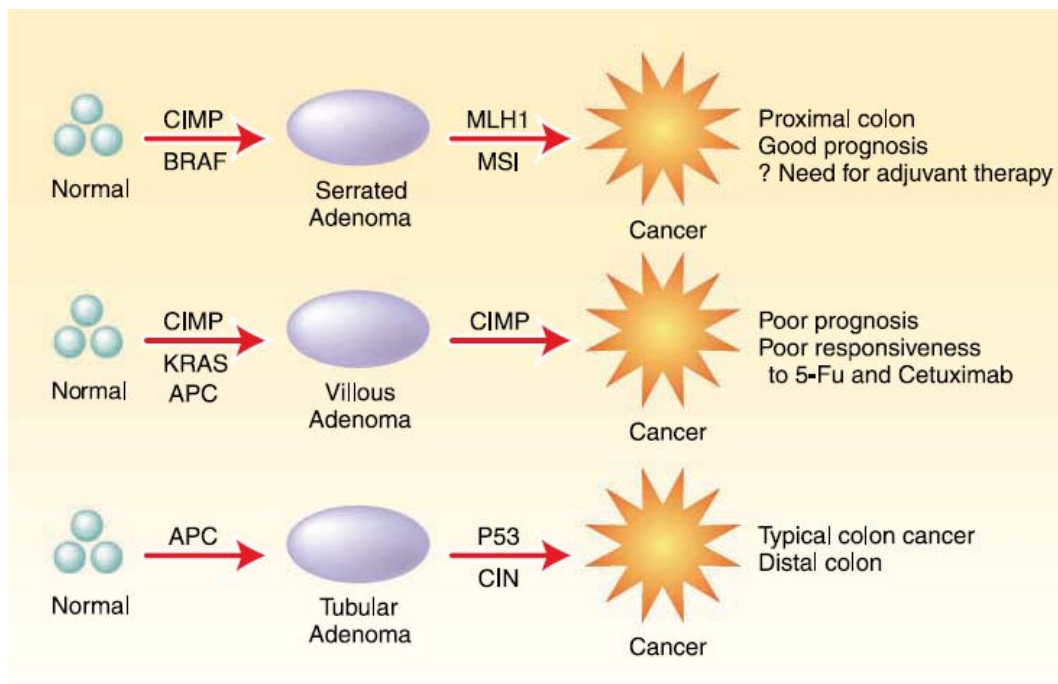
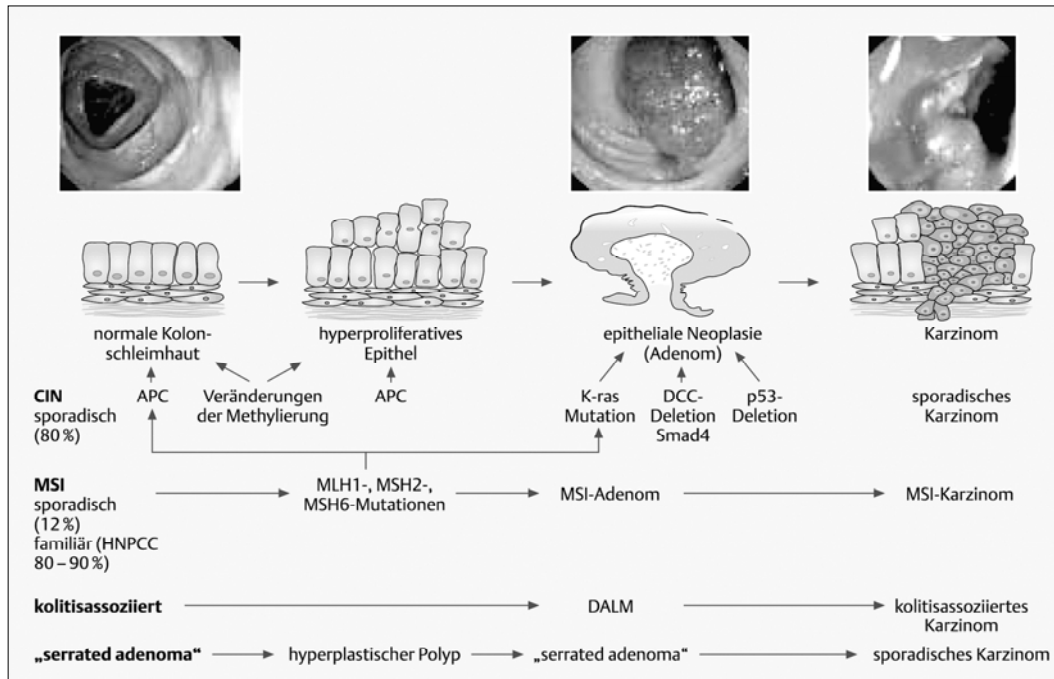
Die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) stellt eine weitere autosomal dominant vererbte obligate Präkanzerose dar und ist für ca. 1% aller KRK verantwortlich. Es liegt ein genetischer Defekt am langen Arm des Chromosoms 5 (5q21-q22), dem APC-Tumorsuppressorgen, vor. Betroffene haben eine ausgeprägte Neigung zur Adenombildung (>100 bis >1000 Polypen); Übersicht in (51). Weitere gastrointestinale Polyposissyndrome mit Entartungsrisiko stellen das Peutz-Jeghers-Syndrom, das Gardner-Syndrom, das Turcot-Syndrom, die Familiäre Juvenile Polyposis und das Cronkhite-Canada-Syndrom dar (49).

Verschiedene Erkrankungen erhöhen das Risiko ein KRK zu entwickeln. Hier ist vor allem die chronisch entzündliche Darmerkrankung Colitis ulcerosa zu nennen. Dabei korreliert das Risiko mit der Dauer der Erkrankung, dem Manifestationsalter und dem Ausmaß des Befalls (33). Das Vorhandensein einer primär sklerosierenden Cholangitis bei Colitis ulcerosa-Patienten erhöht das Risiko weiter (93). Bei Patienten mit Morbus Crohn existieren widersprüchliche Studienergebnisse bezüglich einer erhöhten Inzidenz an KRK (32,113). Frauen mit Karzinomen der Mamma, des Ovars und des Corpus uteri entwickeln häufiger

auch ein KRK (124). Patienten mit Ureterosigmoidostomie haben durch die ständige Reizung der Darmschleimhaut durch den Urin nach ca. 20 bis 30 Jahren ein erhöhtes Risiko an einem KRK zu erkranken (61).

Schon sehr lange wird davon ausgegangen, dass die Entwicklung von Malignomen nicht durch ein einziges Ereignis verursacht wird, sondern vielmehr einer Anhäufung von bestimmten Veränderungen bedarf. Das KRK stellt einen der ersten Tumore dar, in denen die Entwicklung vom Normalgewebe bis zum Karzinom und die damit verbundenen molekularen Veränderungen nachvollzogen werden konnte. In experimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass mindestens drei Schritte in der Entstehung eines Malignoms vollzogen werden müssen: Initiierung, Promotion und Progress (35).

In Abbildung 4 ist das lineare Progressionsmodell der Tumorigenese des KRK, wie sie von Fearon und Vogelstein 1990 postuliert wurde, in modifizierter Form dargestellt. Demnach stellt die Vorstufe des klassischen KRK der adenomatöse Polyp dar. Dieser ist also als prämaligne Veränderung zu betrachten. Der Zeitraum der Entwicklung eines Adenoms bis hin zum Karzinom beträgt Dekaden. Dies kann sicherlich damit begründet werden, dass die Adenom-Karzinom-Sequenz einen mehrstufigen Prozess darstellt, wobei die Akkumulation der molekularen Veränderungen wichtig ist. Die Reihenfolge hingegen spielt keine Rolle (35). Die Entwicklungsschritte beinhalten eine Punktmutation im KRAS-Protoonkogen, eine Hypomethylierung der DNA (kann zur Genaktivierung führen), der Verlust von DNA im APC- und DCC-Gen (beides Tumorsuppressorgene) und eine Mutation des p53-Tumorsuppressorgens. Somit entwickelt sich ein Karzinom zum einen durch Aktivierung eines oder mehrerer Onkogene und zum anderen durch den Verlust von Tumorsuppressorgenen. Der Adenom-Karzinom-Sequenz entsprechend kann sich ein Karzinom nur in den Polypen entwickeln, in denen sich alle mutagenen Veränderungen ereignet haben (35,42). Die klassische Adenom-Karzinom-Sequenz erklärt jedoch nicht alle Fälle von KRK. Issa et al. vertreten die Meinung, dass anstatt eines einzigen linearen Progressionsmodells mindestens drei parallele Wege bestehen, welche zum KRK führen. In Abbildung 5 ist die Tumorentstehung als paralleles Progressionsmodell dargestellt. Es wird konstatiert, dass verschiedene genetische Veränderungen zu unterschiedlichen Tumoren führen, welche sich in der Prognose unterscheiden und einer unterschiedlichen Therapie bedürfen; Übersicht in (66).



Histologisch handelt sich beim KRK hauptsächlich um Adenokarzinome (85-90%). 5-10% der Tumore sind muzinöse Adenokarzinome. Seltenerer Formen (jeweils <1%) stellen das Siegelringzellkarzinom, das kleinzellige Karzinom, das adenosquamöse Karzinom, das Plattenepithelkarzinom, das medulläre Karzinom oder das undifferenzierte Karzinom dar (52).

Die „Union International Contre le Cancer (UICC)“ hat seit den 1940er-Jahren viele Malignome nach dem TNM-System klassifiziert. Diese mittlerweile modifizierte Klassifikation gilt heute als Standard beim Staging des kolorektalen Karzinoms und ist in Tabelle 1-2 dargestellt (2). Die erste Stadieneinteilung wurde jedoch von Dukes, einem Londoner Pathologen, für das Rektumkarzinom getroffen. Diese Klassifikation wurde mehrfach modifiziert und verlor nach Einführung der UICC-Einteilung zunehmend an klinischer Relevanz, so dass sie heute nur noch selten Verwendung findet (28).

UICC-Stadium	T	N	M	Dukes
Stadium 0	TiS	N0	M0	-
Stadium I	T1-2	N0	M0	A
Stadium IIA	T3	N0	M0	B
Stadium IIB	T4a	N0	M0	
Stadium IIC	T4b	N0	M0	
Stadium IIIA	T1-2	N1	M0	C
	T1	N2a		
Stadium IIIB	T3-4	N1	M0	
	T2-3	N2a		
	T1-2	N2b		
Stadium IIIC	T4a	N2a	M0	
	T3-4a	N2b		
	T4b	N1-2		
Stadium IVA	jedes T	jedes N	M1a	-
Stadium IVB	jedes T	jedes N	M1b	

**Tabelle 1-2: Stadieneinteilung des KRK nach UICC und Dukes (2,28)**

Das T-Stadium beschreibt die Invasionstiefe des Tumors. Bei TiS befindet sich der Tumor lediglich in der Mukosa. Im T1-Stadium infiltriert der Tumor bereits die Lamina propria mucosae und die Tela submucosae. Die Tunica muscularis ist bei T2-Tumoren befallen und bei T3-Tumoren ist bereits die Tunica adventitia oder das nichtperitonealisierte perikolische bzw. perirektale Gewebe infiltriert. T4-Tumore haben bereits das viszerale Peritoneum durchbrochen (a) oder sind bis in andere Organe oder Strukturen vorgewachsen (b). Der N-Status gibt an, ob regionale Lymphknoten befallen sind. Bei N0 sind keine Lymphknoten befallen. N1 bedeutet, dass 1-3 regionale Lymphknoten von metastatischen Absiedelungen des Tumors befallen sind, während bei N2 vier oder mehr befallene Lymphknoten gefunden wurden (N2a 4-6 Lymphknoten, N2b 7 oder mehr befallene Lymphknoten). Die Fernmetastasierung wird mit dem M-Stadium beschrieben. M0 bedeutet, dass keine Fernmetastasierung gefunden wurde. Bei M1 wurde ein positiver Nachweis von metastatischen Fernabsiedelungen erbracht. M1a bedeutet, dass ein Organ befallen ist, während bei M1b mehrere Organe oder das Peritoneum betroffen sind. Mit den Buchstaben V und L wird eine Gefäß- bzw. Lymphgefäßinfiltration des Tumors beschrieben. Diese Merkmale haben jedoch keinen Einfluss auf die UICC-Einteilung. Die Tumore werden weiter in Low-grade- und High-grade-Karzinome eingeteilt. Low-grade-Karzinome sind gut (G1) bis mäßig (G2) differenziert. Bei High-grade-Karzinomen zeigt sich eine schlechte (G3) bis keine (G4) Differenzierung (2,31).

## **1.2 Therapie des KRK**

Die Therapie des KRK richtet sich nach der S3 Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ (126). Bei der Therapieentscheidung sind die Lage des Karzinoms (Kolon- oder Rektumkarzinom) und das Tumorstadium ausschlaggebend. Außerdem müssen etwaige Nebenerkrankungen, der Allgemeinzustand und der Wunsch des Patienten berücksichtigt werden.

### **1.2.1 Kolonkarzinom im lokalisierten Stadium (UICC-Stadium 1-3)**

#### **1.2.1.1 Primäre Resektion**

Bei lokalisierten Kolonkarzinomen wird die primäre Resektion angestrebt. Die jeweilige Operation richtet sich nach der Lage des Tumors und das Resektionsausmaß wird durch die trunkuläre Unterbindung der Metastasenstraße

am Ursprung der Hauptversorgungsgefäße bestimmt. Als onkologische Resektionen werden die Hemikolektomie rechts bzw. links, sowie die erweiterte Hemikolektomie rechts bzw. links und die Transversumresektion durchgeführt, in denen der Tumor En-bloc entfernt wird. In Einzelfällen kann auch eine subtotale Kolektomie erforderlich sein. Die Gefäßstämme werden jeweils radikalär abgesetzt. Außerdem sollte eine systematische Lymphadenektomie durchgeführt werden (126,127).

### **1.2.1.2 Adjuvante Chemotherapie**

Die Entscheidung zur adjuvanten Chemotherapie richtet sich nach dem UICC-Stadium. Im UICC-Stadium 1 ist keine adjuvante Therapie indiziert. Bei Patienten im UICC-Stadium 3 sollte eine Chemotherapie durchgeführt werden. Im Stadium 2 wird die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie bei Vorliegen von Risikofaktoren (T4, Tumorperforation/-einriss, Operation unter Notfallbedingungen, Anzahl untersuchter Lymphknoten zu gering) empfohlen. Die Studienlage ist momentan jedoch nicht eindeutig, ob bei Patienten im Stadium 2 ohne Risikofaktoren eine adjuvante Therapie einen Überlebensvorteil bringen könnte. Bei fehlenden Kontraindikationen wird laut S3 Leitlinie im Stadium 3 eine oxaliplatinhaltige Chemotherapie (z.B. FOLFOX4) empfohlen. Im Stadium 2 hingegen kann eine Fluoropyrimidinmonotherapie durchgeführt werden (126).

## **1.2.2 Rektumkarzinom im lokalisierten Stadium (UICC 1-3)**

### **1.2.2.1 Neoadjuvante Therapie**

Bei fortgeschrittenen Rektumkarzinomen ab UICC-Stadium 2 wird eine präoperative Radio-/Chemotherapie zum Downstaging empfohlen. Hierdurch konnte die Rate an kontinenzerhaltenden Operationen erhöht und die lokale Rezidivrate reduziert werden (126).

### **1.2.2.2 Chirurgische Therapie**

Rektumkarzinome, die sich 5-16 cm ab Anokutanlinie befinden, werden mittels einer (tiefen) anterioren Rektumresektion chirurgisch therapiert, während Rektumkarzinome, welche sich weniger als 5 cm von der Anokutanlinie befinden, mittels einer Rektumexstirpation versorgt werden. Die partielle bzw. totale mesorektale Exzision ist mittlerweile Standard bei diesen Operationen (127).



### **1.2.2.3 Adjuvante Therapie**

Falls eine primäre Resektion durchgeführt wurde, ist eine adjuvante Radiochemotherapie im Stadium 2 und 3 indiziert. Im Stadium 1 hingegen wird diese nicht empfohlen. Laut den Leitlinien sollte die Strahlentherapie – falls keine Kontraindikationen bestehen – mit einer 5-FU-Monotherapie kombiniert werden.

In den Fällen, in denen eine neoadjuvante Therapie durchgeführt wurde, ist auch eine adjuvante Radiochemotherapie indiziert. Hierbei kann 5-FU als Monotherapeutikum oder in Kombination mit Folinsäure eingesetzt werden (126).

### **1.2.3 KRK im UICC-Stadium 4**

Primär resektable Metastasen sollten reseziert werden. Bei primär irresektablen Metastasen sollte eine systemische Chemotherapie durchgeführt werden. Es bedarf einer regelmäßigen Reevaluation bezüglich der Resektabilität der Metastasen (126).

In zahlreichen Studien wurde die Wirksamkeit von verschiedenen Substanzen auf das KRK erforscht. Es haben sich nur wenige Agentien bewährt, die heutzutage in verschiedenen Dosierungen und Kombinationen verwendet werden. 5-FU ist wohl die etablierteste Substanz in der chemotherapeutischen Behandlung des KRK und auch bei anderen Tumorerkrankungen. Im metastasierten Zustand werden bei der Monotherapie mit 5-FU jedoch Ansprechraten von nur 10-20% erzeugt. Die Kombination mit neueren Chemotherapeutika wie Oxaliplatin und Irinotecan haben die Ansprechrate auf 40-50% erhöht. Biologicals, wie Cetuximab und Bevacizumab, haben die Behandlungsstrategien um einen Angriffspunkt erweitert; Übersicht in (6). Es hat bereits die molekulare Diagnostik Einzug in die Therapieentscheidung gehalten. Cetuximab als Antikörper gegen EGF-Rezeptoren ist nur wirksam bei KRAS-Wildtyp-Tumoren. Vor Therapie wird daher der KRAS-Status bestimmt; Übersicht in (99).

## **1.3 Epigenetik**

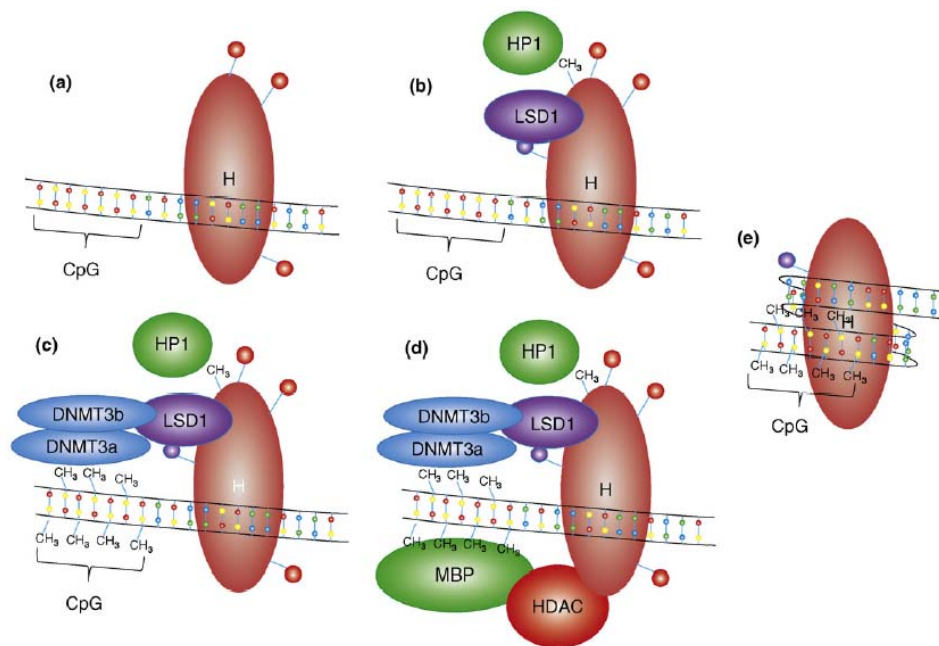
Ursprünglich wurde der Term Epigenetik allgemein auf die Prozesse verwendet, durch welche Gene bestimmte Phänotypen hervorbringen. Die Bedeutung hat sich im Laufe der Zeit verändert. Heutzutage werden hierunter alle Mechanismen zusammengefasst, die in einer Veränderung der Genexpression resultieren ohne

die DNA-Sequenz zu verändern und diese Veränderung auch an nachfolgende Zellen weitergegeben werden kann; Übersicht in (53). Dies geschieht vor allem durch DNA-Methylierung und posttranslationale Histonmodifikation wie Deacetylierung. Auch der Verlust des genomischen Imprinting wird in manchen Quellen zu den epigenetischen Veränderungen gezählt (16); und Übersicht in (129).

Unter Methylierung versteht man eine biochemische Reaktion, welche eine Methylgruppe ( $-\text{CH}_3$ ) an ein Molekül unter Verwendung eines Methyltransferaseenzym (DNMT) hängt. Bisher wurden fünf Methyltransferasen identifiziert (DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b und DNMT3L), wobei man vermutet, dass DNMT2 und DNMT3L nicht als Cytosinmethyltransferasen fungieren (25); und Übersicht in (77). Methylierung erfolgt in der DNA beinahe ausschließlich an Cytosinbasen, welche von Guaninbasen gefolgt werden (Ausnahme: Methylierung von CpA und CpT in embryonalen Stammzellen) (116). Die meisten CG-Sequenzen im Genom sind methyliert, es sei denn, es handelt sich dabei um kurze DNA-Abschnitte mit einem hohen Anteil an CG-Sequenzen, den sog. CpG-Inseln (15). Diese befinden sich meistens in der Promotorregion. Hier ist eine Methylierung sehr selten. Wenn sie methyliert sind, ist die Transkription gestört und das Gen kann nicht mehr exprimiert werden. Es handelt sich dabei um einen physiologischen Prozess, der zur Regulierung der Genexpression beiträgt (41); und Übersicht in (129). Als Beispiel für Gen-Silencing durch Promotormethylierung ist die Inaktivierung des X-Chromosoms bei der Frau zu nennen (79).

Die Abläufe der Methylierung sind mittlerweile gut untersucht, aber noch nicht vollständig verstanden (53). Es ist wohl eine Deacetylierung der Histone notwendig, um die Stilllegung des Gens zu ermöglichen, da erst die Histonmodifikation die strukturelle Konfiguration des Genoms durch elektrostatische Interaktionen zwischen unterschiedlich geladenen Histonen und der negativ geladenen DNA und damit ihre Zugänglichkeit gegenüber Transkriptionsfaktoren verändert (118). Daher hängen diese beiden Vorgänge der Epigenetik vermutlich zusammen. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass es einen acetylierungsunabhängigen Weg des Gensilencing durch Methylierung gibt; Übersicht in (129).

Eine vereinfachte Übersicht über die molekularen Mechanismen der Methylierung ist in Abbildung 6 dargestellt. Unter a) wird die DNA vor der Stilllegung dargestellt. Das Histon (H) ist acetyliert und der DNA-Strang ist nicht methyliert. Danach wird unter b) dargestellt, wie die Lysinspezifische Demethylase 1 (LSD1) und das Heterochromatine Protein 1 (HP1) an verschiedenen Regionen des Histons binden. Abbildung c) zeigt die Rekrutierung der DNA-Methyltransferasen (DNMT3a/DNMT3b) durch LSD1 und HP1, wodurch der DNA-Strang an den Cytosinbasen methyliert wird. Unter d) wird gezeigt, wie sich das Methyl-CpG-bindende-Protein (MBP) an die methylierte DNA hängt und Histondeacetylasen (HDACs) rekrutiert werden. HDACs ermöglichen die Deacetylierung der Histone. Letztendlich (e) kondensiert sich die DNA um die Histone und ist somit epigenetisch inaktiviert (53).



TRENDS in Molecular Medicine

**Abbildung 6: Molekulare Mechanismen der Methylierung (53)**

Wie bereits oben erwähnt, handelt es sich bei Methylierung um einen physiologischen Prozess. Durch Methylierung hervorgerufene Stilllegung von Genen findet sich gehäuft in gealterten Zellen. Daher wird vermutet, dass Methylierung wohl auch ein Prozess des Alterns ist (3,125).

DNA-Hypermethylierung wird auch oft in Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener Tumore genannt. Es wird angenommen – für manche Tumore auch schon bewiesen – dass epigenetische Veränderung sehr häufig in Tumorgenomen vorkommen. Durch diese Modifikationen entsteht eine große molekulare

Diversität, welche durch einen hohen Selektionsdruck zum neoplastischen Phänotyp beitragen kann. In neoplastischen Zellen sind die Promotorregionen speziell von Tumorsuppressorgen überaus häufig hypermethyliert und somit permanent abgeschaltet; Übersicht in (68). Gene, welche sehr häufig in bestimmten Tumoren methyliert sind, sind z.B. RB1 (123), VHL (55), INK4a (96), hMLH1 (71) und E-CAD (48). Vor allem im KKR wird Methylierung als sehr frühes Ereignis der Karzinomentstehung beschrieben (3).

## 1.4 CIMP

### 1.4.1 Definition von CIMP

Bei manchen Tumoren des Kolorektums wurde eine außerordentlich hohe Frequenz von Methylierung bestimmter CpG-Inseln gefunden. Daher wurde 1999 der Begriff des „CpG island methylator phenotype“ (CIMP) formuliert. Die Regionen mit den methylierten CpG-Inseln wurden als MINT-Loci (methylated-in-tumor) bezeichnet. Dabei wurde zwischen altersbedingter (Typ A-Methylierung; aging-specific methylation) und tumorassoziierter (Typ C-Methylierung; cancer-specific methylation) Methylierung unterschieden (136).

Als Ursache von CIMP werden zwei Möglichkeiten diskutiert. Zum Einen wird eine genetische Ursache für möglich gehalten, zum Anderen könnten Umweltfaktoren verantwortlich sein. Als genetische Ursache käme eine spezifische Aktivierung der Methyltransferasen oder eine Inaktivierung der Faktoren, die eine Methylierung verhindern sollen, in Betracht. Hierfür gibt es jedoch noch keine Beweise. Insbesondere wurde keine spezifische Mutation in den Methyltransferasen gefunden; Übersichten in (65,68). Für eine genetische Ursache spricht eine familiäre Häufung von CIMP-positiven Fällen (39). Für die Theorie der umweltbedingten Methylierung spricht die Tatsache, dass in chronisch entzündetem Gewebe ein höherer Grad der Methylierung gefunden wurde und daher die Entzündung an sich oder eine überschießende Reaktion des Körpers auf die Entzündung ursächlich für die Entstehung von CIMP sein könnte (67).

Es hat sich herauskristalisiert, dass CIMP-positive Tumore spezifische klinische, pathologische und molekulare Eigenschaften haben. Dabei wird oftmals eine proximale Tumorlokalisation, weibliches Geschlecht, familiäre Häufung,

muzinöse oder Siegelringzell-Histologie, schlechte Differenzierung, hohe BRAF-Mutationen, MSI-H, sowie geringe chromosomale Instabilität und p53-Mutationsraten beobachtet (8,39,45,100,107,141). Kontroverse Ergebnisse hatten sich in einer Assoziation von KRAS-Mutationen und CIMP-positiven Fällen gezeigt (130). Dies ist nach neueren Ansätzen auf eine Unterteilung des CIMP-Status in CIMP-low und -high zurückzuführen. So wird vermutet, dass CIMP-high mit einer BRAF-Mutation und CIMP-low mit einer KRAS-Mutation assoziiert ist (105,130,148). In einem kleinen Anteil der KRK zeigt sich das Mismatchrepair-Gen hMLH1 methyliert. Hierdurch entstehen Tumore mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI) (71). CIMP liegt vielen Fällen von sporadischen MSI-Fällen zugrunde (136).

In der Literatur wurden viele CIMP-Marker beschrieben. Es ergab sich das Problem der Auswahl der Marker zur Bestimmung des CIMP-Status. Issa et al. wiesen bereits 2004 auf das Problem der Auswahl der Marker hin. Es wurden weitere Studien zur Identifikation eines Marker-Panels gefordert und darauf hingewiesen, dass die Panels für bestimmte Tumoren nicht auf andere Tumore übertragen werden können. Die Arbeitsgruppe um Issa arbeitete mit den Markern MINT1, MINT2, MINT 31, CDKN2A und MLH1 (65). Weisenberger et al. führten 2006 ein weiteres Panel mit fünf CIMP-Markern ein. Dieses Panel besteht aus CACNA1G, IGF2, Neurog1, RUNX3 und SOCS1. Ein Tumor wird als CIMP-positiv betrachtet, wenn mindestens drei der fünf Marker positiv sind (145). Ogino et al. schlugen ebenfalls 2006 eine weitere Unterteilung des CIMP-Status in CIMP-high und CIMP-low vor. Das dafür eingeführte Panel an Markern besteht aus CACNA1G, CDKN2A (p16), CRABP1, MLH1 und Neurog1. CIMP-high-Status würden Tumore mit vier bzw. fünf positiven Markern erhalten. Als CIMP-low werden demnach diejenigen Tumore gelten, die in weniger als vier Markern methyliert sind (105). Ein Jahr später verglichen Ogino und Kollegen die bestehenden Panels miteinander und kamen zu dem Schluss, dass mindestens vier Marker zur Evaluation des CIMP-Status eingesetzt werden sollten. In absteigender Spezifität und Sensitivität sind dies RUNX3, CACNA1G, IGF2 und MLH1 (104). Es wird auch kontrovers diskutiert, ob CIMP-low existiert. Yagi et al. gingen 2010 sogar noch einen Schritt weiter und unterteilten die KRK in drei bestimmte Gruppen mit verschiedenen genetischen Charakteristika. Es wurden neue Panels an Markern etabliert, um eine Einteilung zu high-, intermediate- und

low-methylierten Epigenotypen treffen zu können. Um die high-methylierten Epigenotypen zu identifizieren, werden Gruppe-1 Marker (CACNA1G, LOX, SLC30A10) verwendet. Bei zwei oder drei positiven Gruppe-1 Markern wird von einer high-Methylierung ausgegangen. Die verbleibenden Fälle werden auf Methylierungen in den Gruppe-2 Markern (ELMO1, FBN2, THBD, HAND1, SLC30A10) untersucht, um die intermediate- und low-methylierten Epigenotypen ausfindig zu machen. Wenn drei oder mehr Marker positiv sind, handelt es sich um intermediate-methyliert, bei weniger als drei methylierten Markern um low-methyliert. Es wurde gezeigt, dass die intermediate-methylierten Epigenotypen stark mit einer KRAS-Mutation korrelierten (146). Es ist davon auszugehen, dass dies nicht die letzte Einteilung von CIMP sein wird und es werden auch noch weitere Panels zur Erhebung des CIMP-Status folgen. Eine standardisierte Festlegung von CIMP-Markern ist bis heute noch nicht erfolgt; Übersicht in (60).

#### **1.4.2 CIMP-Marker**

In der Literatur werden diverse CIMP-Marker und Panels beschrieben, um den CIMP-Status zu ermitteln. SOCS1, RUNX3 und p16 sind drei bekannte Vertreter dieser Gruppe (145).

##### **1.4.2.1 p16**

“Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A” (CDKN2A/INK4a) ist auf dem Chromosom 9 (9p21) lokalisiert (128). Es fungiert als Tumorsuppressorgen (135). Das p16-Protein bindet an die CDK4- und CDK6-Kinasen und inhibiert diese. Es wird der Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus verhindert. Hierdurch wird der Zellzyklus angehalten (88). p16 ist in vielen Tumoren verändert oder gelöscht (70).

##### **1.4.2.2 SOCS1**

„Suppressor of cytokine signaling 1“ (SOCS1) ist auf dem Chromosom 16 (16p13.13) lokalisiert (75). Die Expression dieses Gens kann durch eine Reihe von Zytokinen (z.B. IL2, IL3, IL4, IL6, EPO, CSF2/GM-CSF, IFN- $\gamma$ ) induziert werden. Das Produkt des Gens wirkt in einer negativen Feedback-Schleife und schwächt die Signalkaskade von Zytokinen ab. SOCS1 bindet direkt an die

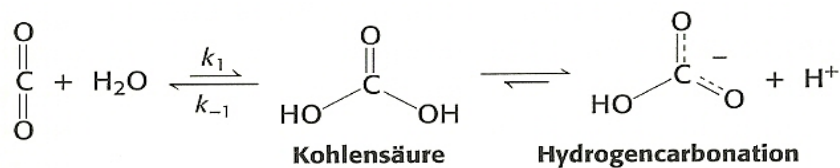
Januskinase (JAK) und verhindert deren katalytische Aktivität (76). Es wird vermutet, dass es immunmodulierend wirkt (5).

### 1.4.2.3 RUNX3

„Runt-related transcription factor 3“ (RUNX3)/AML2 ist auf dem Chromosom 1 (1p36) lokalisiert (83). RUNX3 ist beteiligt an der Entstehung des Nervensystems, sowie der Osteogenese und spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr (115). Es wird auch in hämatopoetischen Zellen gefunden (80). RUNX3 ist in verschiedenen soliden Tumoren oft durch Promotormethylierung inaktiviert, jedoch weniger oft durch Deletion, Punktmutation oder Proteinveränderungen (81,115). Es gibt sehr viele Hinweise dafür, dass RUNX3 als Tumorsuppressorgen fungiert. Eine verminderte Expression wird oft in epithelialen Karzinomen wie Kolon-, Magen- und Pankreaskarzinomen gefunden. Der Verlust oder die herabgesetzte Expression von RUNX3 korreliert negativ mit dem Überleben der Patienten und ist ein unabhängiger prädiktiver Faktor für ein schlechtes Outcome (21,84).

## 1.5 CA4

CA4 liegt auf dem Chromosom 17 mit der Lokalisation 17q23 (57). Das Produkt von CA4 – die Carboanhydrase IV – gehört zur Familie der Carboanhydrasen. Diese sind eine große Familie von Zink-Metalloenzymen, welche die reversible Hydratation von Kohlendioxid katalysieren.

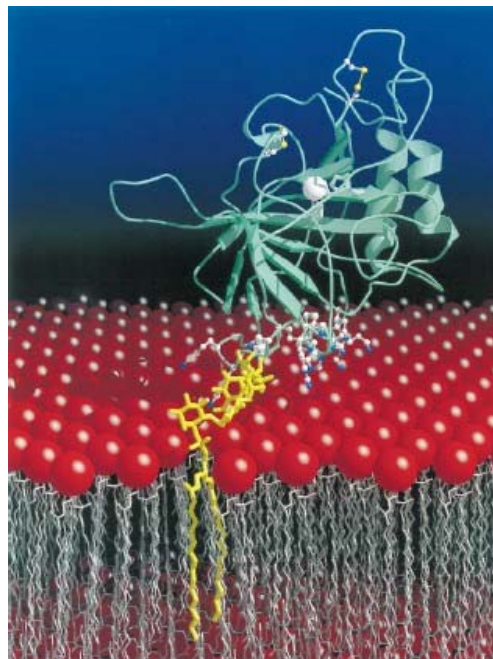


**Abbildung 7: Carboanhydrasen katalysieren die CO<sub>2</sub>-Hydratisierung (13)**

Es wurden 14 Isoformen von  $\alpha$ -Carboanhydrasen isoliert.  $\alpha$ -Carboanhydrasen kommen in Vertebraten vor. Die verschiedenen Carboanhydrasen unterscheiden sich in ihrer katalytischen Aktivität und Organdistribution. Vier der Isoformen sind membrangebunden (CA IV, IX, XII und XIV), eine befindet sich in den Mitochondrien (CA V) und CA VI ist im Speichel nachweisbar. Die restlichen Isoformen befinden sich intrazellulär (37,64); und Übersicht in (74).

Carboanhydrasen nehmen an einer Reihe von biologischen Prozessen teil, einschließlich Atmung, Kalzifizierung, Knochenresorption und der Bildung von cerebrospinaler Flüssigkeit, Speichel und Magensäure (19,119); und Übersicht in (74). In verschiedenen Organen regeln die Carboanhydrasen das pH-Gleichgewicht (18).

Nur CA IV ist über einen Glycosylphosphatidylinositolanker mit der Membran verbunden (147). Der Glycosylphosphatidyl-inositol-Schwanz verankert das Molekül in der Membran und sorgt dafür, dass das aktive Zentrum zum Lumen hin orientiert ist (133).



**Abbildung 8: Carboanhydrase IV mit Glycosylphosphatidyl-inositol-Anker (134)**

Die Carboanhydrase IV kann in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden, wie der luminalen Oberfläche von Lungen- und Gehirnkapillaren, den proximalen Nierentubuli, dem Kolon, der Nasenschleimhaut, dem Epithel des Ösophagus, der Speicheldrüsen, dem Herzmuskel, den Gallengängen, den Augen und im Pankreas (19,64); und Übersicht in (74). Speziell im Kolon wurde CA IV durch immunhistochemische Methoden an der apikalen Plasmamembran des Schleimhautepithels nachgewiesen. Außerdem wurde CA IV im Kapillarendothel der Submukosa des gesamten Gastrointestinaltraktes gefunden (37).



## 2 Zielsetzung

Der erste Teil der Arbeit besteht aus der statistischen Analyse eines Kollektivs von 162 Patienten mit KRK aus der Region Oberpfalz. Dieses Kollektiv wird hinsichtlich prätherapeutischer Behandlungssituation, Tumorlokalisation und -histologie, Therapie, Rezidivinzidenz und Überleben analysiert. Es soll ein Überblick bezüglich dieser Merkmale in der Region erarbeitet werden.

Im zweiten Teil wird untersucht, ob die Promotormethylierung von CA4 auf die Aggressivität (Grading, Tumorstadium, Rezidive, Gesamtüberleben) des Tumors Einfluss hat. Außerdem wird der Methylierungsstatus mit molekularen Charakteristika wie MSI-Status, CIN, KRAS- und BRAF-Mutation, sowie dem p53- und CIMP-Status korreliert. Ferner wird überprüft, ob sich eine Methylierungsanalyse von CA4 zur prätherapeutischen Evaluation einer Chemotherapie eignet und es sich somit um einen prädiktiven und prognostischen Marker handelt.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien und Geräte

#### 3.1.1 Geräte

Heizblöcke:	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
Thermocycler:	LightCycler 2.0 (Roche, Mannheim)
Zentrifugen:	Centrifuge 5415 D und 5415 R (Eppendorf, Hamburg) LC Carousel Centrifuge (Roche, Mannheim)
Vortexer:	MS2 Minishaker (IKA-Labortechnik, Staufen)
Kapillaren:	LightCycler® Capillaries (Roche, Mannheim)
Pipetten:	Finnpipette® (Thermo Labsystems, Vantaa, Finnland)
Pipettenspitzen:	Safeseal Tips Premium (Biozym, Oldendorf)
Reaktionsgefäße:	Safe-Lock-Tubes (Eppendorf, Hamburg)
Photometer:	Spectrophotometer ND-1000 (Peglab, Erlangen)
Brutschrank:	Heraeus Typ B6060 (Heraeus, Osterode)
Software:	Microsoft Excel und Word (Microsoft, Unterschleißheim) PASW 18 (IBM, Ehningen) RelQant 1.0 Software (Roche, Mannheim)

#### 3.1.2 Chemikalien

Restriktionsendonukleasen	Hin6I, XbaI, DraI (Fermentas, Burlington, Kanada)
QuantiTect® SYBR Green PCR Kit	(Qiagen, Hilden)
Tango 10x Buffer	(Fermentas, Burlington, Kanada)
HPLC-Wasser	(Qiagen, Hilden)
Oligonukleotide	(Metabion, Martinsried)

### 3.1.3 Patientengut

Die Gewebeproben, aus denen die DNA isoliert wurde, stammen aus dem Archiv des Institutes für Pathologie der Universität Regensburg. Sie wurden im Zeitraum von 1993 bis 2004 gesammelt.

### 3.1.4 CIMP-Marker

Zur Auswahl der CIMP-Marker wurde das Panel von Weisenberger (145) herangezogen. Dieses besteht aus den Markern CACNA1G, IGF2, Neurog1, RUNX3 und SOCS1. CACNA1G wurde jedoch in dieser Arbeit gegen p16 ersetzt.

### 3.1.5 Kontrollen

Die Kontrollen zur Methylierungsanalyse wurden dem gleichen Prozess unterzogen, wie die zu analysierende DNA. Sie wurden ebenfalls verdaut und in die PCR eingesetzt. Jede Testreihe wurde mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle durchgeführt. SW48 ist eine humane KRK-Zelllinie und stammt von ATCC. Sie wurde als Positivkontrolle in der Methylierungsanalyse eingesetzt (100% Methylierung). Als Negativkontrolle in der Methylierungsanalyse wurde DNA von gesunden Probanden (=“Blut“) eingesetzt (0% Methylierung).

### 3.1.6 Oligonukleotidsequenzen

Alle Primer wurden mit Hilfe der Primer 3 Software designed und von der Firma Metabion in Martinsried hergestellt.

Primer	Annealing-Temperatur
CA4	
CA4 MSDIG F1: 5'-AAA CCA GGG ACC AGG AGT AGG-3'	62°C
CA4 MSDIG R1: 5'-CTC ATC TGA AAT CCT CCG CTC T-3'	
p16	
p16 MSDIG F1: 5'-ATG GAG CCT TCG GCT GAC T-3'	60°C
p16 MSDIG R1: 5'-GGC CTC CGA CCG TAA CTA TTC-3'	

SOCS1	
SOCS1 QESD F1: 5'-TTC CGT TCG CAC GCC GAT TAC C-3'	68°C
SOCS1 QESD R1: 5'-ACG CTC AGG GGC CCC CAG TAG-3'	
RUNX3	
RUNX3 QESD1F1: 5'-GCC AGC ACG TCC ACC ATC GAG-3'	68°C
RUNX3 QESD1R1: 5'-CGG CAA GAT GGG CGA GAA CAG-3'	

**Tabelle 3-1: Primerpaare zur Analyse von CA4, p16, SOCS1 und RUNX3 mit Annealing-Temperatur**

## 3.2 Patientengut

### 3.2.1 Definition der Patientenkollektive

Das Ausgangskollektiv ist eine heterogene Gruppe von Patienten mit KRK. Hiervon leitet sich eine Subgruppe ab mit Fällen ausschließlich im UICC-Stadium 3. Um die Fallzahl zu erhöhen, wurden weitere Fälle im UICC-Stadium 3 hinzugenommen. Somit besteht das Kollektiv, an dem die Methylierungsanalyse durchgeführt wird, aus allen Fällen des Ausgangskollektives im UICC-Stadium 3 plus weitere KRK-Patienten im UICC-Stadium 3. Die klinischen Daten wurden aus dem Tumorzentrum Regensburg und den Krankenakten der Patienten akquiriert.

### 3.2.2 Beschreibung Ausgangskollektiv

Es wurden 162 Fälle mit erstmalig diagnostiziertem KRK untersucht, deren Gewebeproben am Institut für Pathologie der Universität Regensburg im Zeitraum von 1993 bis 2004 untersucht worden sind. Dabei wurden nur Fälle ausgewählt, bei denen eine ausreichende Mengen an Material zur Analyse vorlag.

Ein Großteil der Fälle wurde am Universitätsklinikum Regensburg behandelt. Die restlichen Fälle wurden an anderen Krankenhäusern der Region operiert, welche die histologische Aufarbeitung der Präparate am Institut für Pathologie der Universität Regensburg durchführen lassen.

Zu diesen Fällen wurden histopathologische und klinische Daten gesammelt. Die histopathologischen Daten wurden aus dem Computersystem des Institutes für Pathologie entnommen. Klinische Daten und die Nachbeobachtung wurde vom Tumorzentrum Regensburg bereitgestellt und fehlende Daten wurden aus

Patientenakten im Krankenaktenarchiv des Universitätsklinikums Regensburg bzw. der jeweiligen behandelnden Krankenhäuser mit deren Genehmigung ergänzt.

Das Ausgangskollektiv setzt sich aus 88 männlichen und 74 weiblichen Patienten zusammen. Der Anteil an unter 70-Jährigen zum Zeitpunkt der Diagnose beträgt 63%. Dementsprechend waren 37% der Patienten über 70 Jahre alt, als das KRK diagnostiziert wurde. Die Spannweite beträgt 59 Jahre (Minimum 27 Jahre, Maximum 86 Jahre). Im Mittel waren die Patienten zum Diagnosezeitpunkt 65,04 Jahre alt (Median 65,00 Jahre).

Variable	Häufigkeit	
	(n=162)	
	n	%
<b>Geschlecht</b>		
männlich	88	54,3
weiblich	74	45,7
<b>Alter (Diagnose)</b>		
20-29 Jahre	1	0,6
30-39 Jahre	3	1,9
40-49 Jahre	6	3,7
50-59 Jahre	36	22,2
60-69 Jahre	56	34,6
70-79 Jahre	46	28,4
80-89 Jahre	14	8,6

Tabelle 3-2: Verteilung von Geschlecht und Alter im Ausgangskollektiv

### 3.2.3 Beschreibung Subgruppe im UICC-Stadium 3

Hierbei handelt es sich um alle Fälle im UICC-Stadium 3 des Ausgangskollektivs, ergänzt durch weitere Fälle von KRK im UICC-Stadium 3, deren Daten bereits vorlagen. Somit ist diese Gruppe, bestehend aus 148 Fällen, sehr homogen. An diesen Fällen wurde die Methylierungsanalyse von CA4 und den CIMP-Markern durchgeführt. Die Homogenität des Kollektives wurde gewählt, um eine gute Vergleichbarkeit der Fälle zu gewährleisten.

Es handelt sich dabei um 74 weibliche und 74 männliche Patienten. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Diagnose betrug 66,47 Jahre (Median 66,0) mit einer Spannweite von 54 Jahren (41-95 Jahre).

Chirurgische Behandlung ohne weitere onkologische Therapie hatten 44 Patienten erhalten, während 104 der Patienten zusätzlich einer 5-FU-/Leucovorin-haltigen Chemotherapie zugeführt worden waren. Keiner der Patienten hatte eine neoadjuvante Therapie erhalten.

In der folgenden Tabelle 3-3 sind die Altersverteilung und die histopathologischen Daten in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe dargestellt.

Variable	Insgesamt (n=148)		Chemotherapie (n =104)		keine Chemotherapie (n = 44)	
	n	%	n	%	n	%
<b>Alter (Diagnose)</b>						
≤ 70	94	63,5	78	75	16	36,4
> 70	54	36,5	26	25	28	63,6
<b>Tumorstadium</b>						
pT1	2	1,4	2	1,9	0	0
pT2	15	10,1	9	8,7	6	13,6
pT3	89	60,1	60	57,7	29	65,9
pT4	42	28,4	33	31,7	9	20,5
<b>Nodalstatus</b>						
pN1	97	65,5	68	65,4	29	65,9
pN2	51	34,5	36	34,6	15	34,1
<b>Grading</b>						
G2	89	60,1	61	58,7	28	63,6
G3	59	39,9	43	41,3	16	36,4

Tabelle 3-3: Alter, T-Stadium, Nodalstatus und Grading der Fälle im UICC-Stadium 3

### 3.3 Methylierungsanalyse

#### 3.3.1 Das Prinzip von QESD

QESD (Quantifizierung Endonuklease-resistenter DNA) basiert auf einer Kombination eines methylierungs-sensitiven Verdaus und einer real-time PCR (14).

##### 3.3.1.1 Methylierungs-sensitiver Hin6I-Verdau

Die Restriktionsendonuklease Hin6I wird zur DNA gegeben, die es zu analysieren gilt. Hin6I erkennt GCGC-Sequenzen und schneidet an dieser Stelle. Dies ist jedoch nicht möglich, wenn hier eine Methylierung vorliegt. Methylierung schützt also den DNA-Strang vor einer Verdauung durch Hin6I. Ein methylierter DNA-Strang bleibt als ganzer Strang erhalten, während nichtmethylierte GCGC-Sequenzen geschnitten werden und somit die Kontinuität unterbrochen wird.

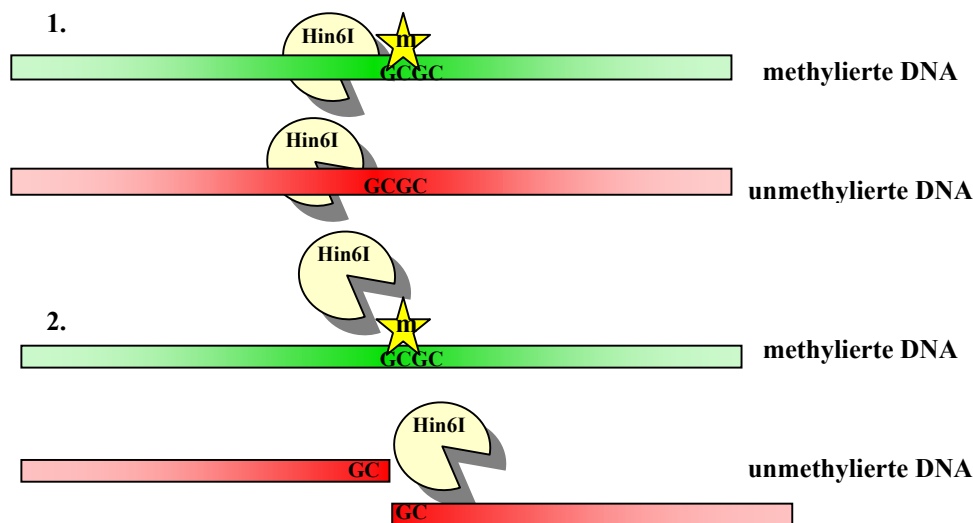


Abbildung 9: Darstellung des methylierungs-sensitiven Verdaus mit Hin6I

##### 3.3.1.2 Kalibratorverdau

Um später den Anteil der methylierten DNA errechnen zu können, muss zusätzlich eine nicht mit Hin6I verdaute Probe der DNA vorbereitet werden, welche dann als Referenz-DNA dient.

Um die Zugänglichkeit der im nächsten Schritt durchzuführenden PCR zu erhöhen, wird auch diese DNA mit Restriktionsendonukleasen verdaut. In diesem Fall werden XbaI und DraI eingesetzt, welche die DNA fragmentieren. Wichtig

ist, dass diese Enzyme nicht in der später zu analysierenden Region schneiden. Sie dienen lediglich dazu, die PCR-Effizienz der des methylierungs-sensitiven Verdaus gleichzusetzen und somit eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

### 3.3.1.3 Quantitative PCR (qPCR)

Die mit Hin6I verdaute DNA (Quantifizierungs-DNA) und die Kalibrator-DNA werden als Template in die PCR eingesetzt. Da im Quantifizierungsansatz nur die methylierten DNA-Abschnitte als ganzer Strang erhalten sind, kann nur an diesen die Amplifikation stattfinden. Nicht-methylierte DNA-Anteile wurden verdaut und sind somit nicht amplifizierbar. Der Kalibratoransatz ist unabhängig von der Methylierung und dient als Referenz.

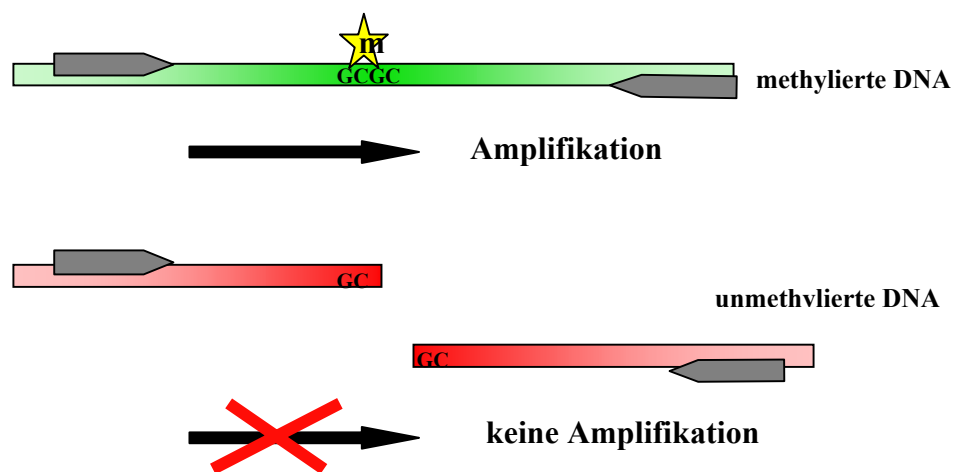


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Ablaufes der PCR des Quantifizierungsansatzes

Durch diese PCR werden die Ct-Werte des Quantifizierungs- und des Kalibratoransatzes ermittelt. Die Differenz dieser zwei Ct-Werte ergibt den  $\Delta\text{Ct}$ -Wert. Zusammen mit der Effizienz (E) der PCR ergibt sich die Formel:

$$E^{\Delta\text{Ct}} \times 100 = \text{Methylierung in \%}$$

### 3.3.2 Verdau

Je Probe wurden zwei Verdaue in 1,5 ml-Cups angesetzt. Wie oben erwähnt, wurden ein Quantifizierungsansatz mit Hin6I und ein Kalibratoransatz mit XbaI und DraI hergestellt:



Quantifizierungsverdau	Kalibratorverdau
DNA 5,0 µl (DNA-Menge 20-200 ng/µl)	
10x Tango-Puffer 2,0 µl	
Hin6I (10u/µl) 3,0 µl = 30 U	XbaI (10u/µl) 1,5 µl = 15 U
	DraI (10u/µl) 1,5 µl = 15 U
HPLC-Wasserad 20,0 µl	

**Tabelle 3-4: Ansätze für den Quantifizierungs- und Kalibratorverdau**

Wenn die DNA-Konzentration der Probe 20 ng/µl unterschritten hatte, wurde die doppelte Menge an DNA eingesetzt.

Die Ansätze wurden eine Minute lang bei 13000 upm zentrifugiert, um eventuelle Rückstände an der Wand der Cups in die Lösung zu überführen. Danach wurden die Cups im Vortexer gut gemischt. Dann wurden sie nochmals 10 Sekunden lang bei 13000 upm abzentrifugiert.

Die Verdaue wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Tests hatten ergeben, dass bereits nach einer Inkubation von 4 Stunden Hin6I die DNA nahezu vollständig geschnitten hatte. Der längere Zeitraum wurde gewählt, um sicher zu gewährleisten, dass die Restriktionsendonuklease alle Schnittstellen geschnitten hatte und um den Ablauf zu vereinfachen.

Am darauffolgenden Tag wurden die Restriktionsenzyme 20 Minuten lang bei 70°C in einem Heizblock inaktiviert und dann sofort auf Eis abgekühlt. Das Kondenswasser wurde abzentrifugiert, die Proben nochmals kurz im Vortexer gemischt und dann bei 4°C gelagert.

### 3.3.3 Quantitative PCR

Als nächster Schritt erfolgte eine real-time PCR am LightCycler. Die Proben zur Analyse von CA4 und p16 wurden jeweils in Duplikaten eingesetzt, also 2 Ansätze des Quantifizierungsverdaus und 2 Ansätze des Kalibratorverdaus. Die Methylierungsanalyse von SOCS1 und RUNX3 wurde mit Einzelansätzen durchgeführt. Auch die Kontrollen wurden als Einfachansätze in die real-time PCR eingesetzt.

Die PCR wurde mit 20 µl-Ansätzen durchgeführt. In jedem Ansatz befanden sich 7,1 µl HPLC-Wasser, 10,0 µl QuantiTect® SYBR Green PCR Kit, 0,4 µl Primermix (siehe 3.1.6 Oligonukleotidsequenzen) und 2,5 µl Template aus dem Verdau.

Mittels DNA-Verdünnungsreihen wurden „fit coefficient files“ erstellt. Aus diesen wurde die Effizienz der PCR ( $E=10^{-1/\text{slope}}$ ) berechnet. In der Analyse der Promotormethylierung von CA4 konnte eine Effizienz von 1,93, bei p16 von 2, bei RUNX3 von 1,84 und bei SOCS1 von 1,91 erreicht werden.

Die Ct-Werte wurden automatisch über die „Second Derivative Maximum-Methode“ bestimmt. Bei ungleichmäßigem Fluoreszenzkurvenverlauf wurde in wenigen Ausnahmefällen die Ct-Wert-Bestimmung durch die manuelle Festlegung von Fit Points vorgenommen. Bei Fällen, in denen die Crossing-Points des Kalibratoransatzes über 35 Zyklen (bei insgesamt 45 Zyklen) lagen und eine Methylierung von 0% vorlag, wurde entweder die PCR mit einer größeren DNA-Menge erneut durchgeführt oder ein neuer Verdau dieser Probe angesetzt. Hierdurch sollten falsch negative Fälle vermieden werden. Der maximal verwendete Crossing-Point lag bei 43,58. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen wurden Mehrfachansätze durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

Die PCR-Programme unterschieden sich für die jeweiligen Marker. Im Anhang wurde exemplarisch ein LC-Protokoll für jeden Marker hinterlegt, denen Details entnommen werden können.

#### **3.3.3.1 PCR-Programm zur Analyse von CA4**

*Denaturierung:* 94°C über 15 min

*Amplifikation:* 45 Zyklen; 10 sek./95°C, 17 sek./62°C und 6 sek./72°C

*Schmelzkurve:* langsames Erhitzen mit 0,2°C/sek. von 60°C bis 99°C bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung

#### **3.3.3.2 PCR-Programm zur Analyse von p16**

*Denaturierung:* 94°C über 15 min

*Amplifikation:* 45 Zyklen; 10 sek./94°C, 17 sek./60°C, 7 sek./72°C und 1 sek./80°C

*Schmelzkurve:* langsames Erhitzen mit 0,15°C/sek. von 60°C bis 95°C bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung

### 3.3.3.3 PCR-Programm zur Analyse von SOCS1

*Denaturierung:* 95°C über 15 min

*Amplifikation:* 45 Zyklen; 10 sek./95°C, 20 sek./68°C

*Schmelzkurve:* langsames Erhitzen mit 0,15°C/sek. von 60°C bis 98°C bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung

### 3.3.3.4 PCR-Programm zur Analyse von RUNX3

*Denaturierung:* 95°C über 15 min

*Amplifikation:* 45 Zyklen; 15 sek./95°C, 20 sek./68°C

*Schmelzkurve:* langsames Erhitzen mit 0,5°C/sek. von 65°C bis 99°C bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung

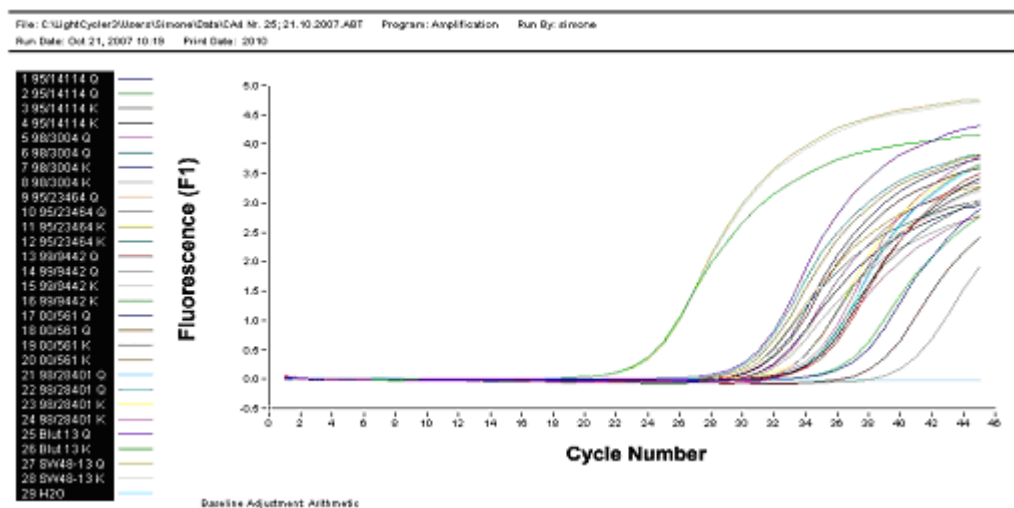


Abbildung 11: Beispiel Real-time-quantitative-PCR zur Methylierungsanalyse

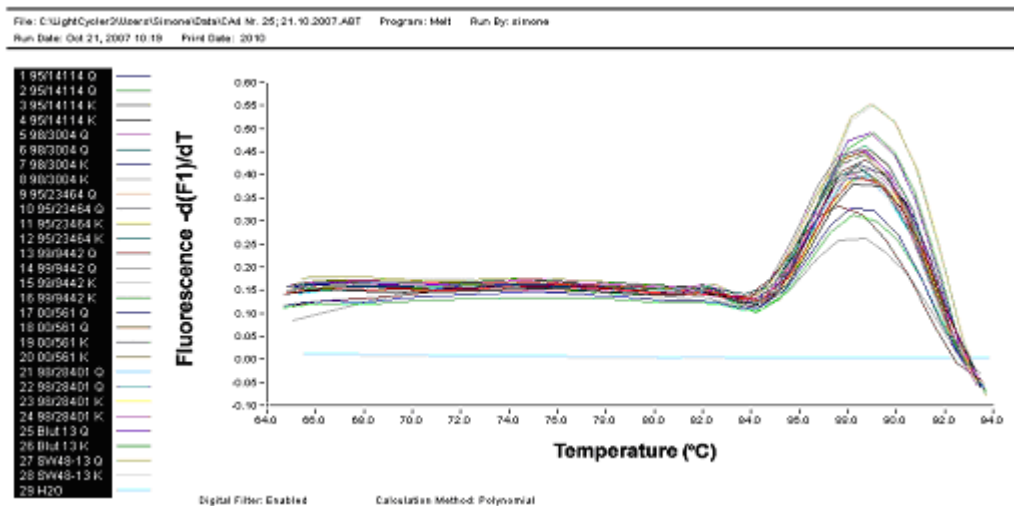


Abbildung 12: Schmelzkurve zur Real-time-quantitative-PCR aus Abb. 11

### 3.3.4 Quantifizierung

Aus den Ct-Werten der Doppelansätze wurde das arithmetische Mittel errechnet. Die Mittelwerte der Ct-Werte des Quantifizierungs- und des Kalibratoransatzes wurden subtrahiert ( $=\Delta Ct$ ). Setzt man diesen Wert in die Formel  $E^{\Delta Ct} \times 100$  ( $E$  = PCR-Effizienz) ein, erhält man den prozentualen Anteil der methylierten DNA-Moleküle. Diese Berechnung wurde mit dem Computerprogramm Excel durchgeführt. Werte über 100% wurden als 100% Methylierung gewertet.

Abbildung 13 zeigt die Berechnung der prozentualen Methylierung der Fälle aus Abbildung 11 und 12 im Programm Excel.

1,93 PCR-Effizienz							
Probe	CP Quant		CP Kal		Median CP	delta CP	Methylierung (%)
Fall 1	1	36,81	1	34,64	36,54	-2,1	26
	2	36,27	2	34,32	34,48		
Fall 2	1	33,62	1	31,32	33,625	-2,1	24
	2	33,63	2	31,65	31,485		
Fall 3	1	31,57	1	30,47	31,62	-1,2	45
	2	31,67	2	30,33	30,4		

Fall 4	1	38	1	32,93	39,5	-6,6	1
	2	41	2	32,88	32,905		
Fall 5	1	31,3	1	30,23	31,385	-1	52
	2	31,47	2	30,57	30,4		
Fall 6	1	34,27	1	33,53	34,285	-0,5	73
	2	34,3	2	34,07	33,8		
Blut	1	30,5	1	23,67	30,5	-6,8	1
	2	-	2	-	23,67		
SW48	1	24,04	1	24,1	24,04	0,1	104
	2	-	2	-	24,1		

**Abbildung 13: Ct- und Methylierungswerte zur real-time PCR in Abbildung 11**  
 (CP=Crossing Point, Quant=Quantifizierungsansatz, Kal=Kalibratoransatz,  
 Blut=Negativkontrolle, SW48=Positivkontrolle)

### 3.4 Daten

#### 3.4.1 Molekulare und immunhistochemische Daten

IGF2 und Neurog1 sind zwei CIMP-Marker, deren Werte freundlicherweise von Felix Steger zur Verfügung gestellt wurden (Dissertation in Arbeit). Die molekularen (MSI-Status, KRAS-, BRAF-Mutation (26) und CIN) und immunhistochemischen Daten (p53-Verlust (26)) zu den Fällen wurden am Institut für Pathologie der Universität Regensburg erhoben. Der CIN-Status war mittels FISH ermittelt worden.

### 3.5 Statistische Auswertung

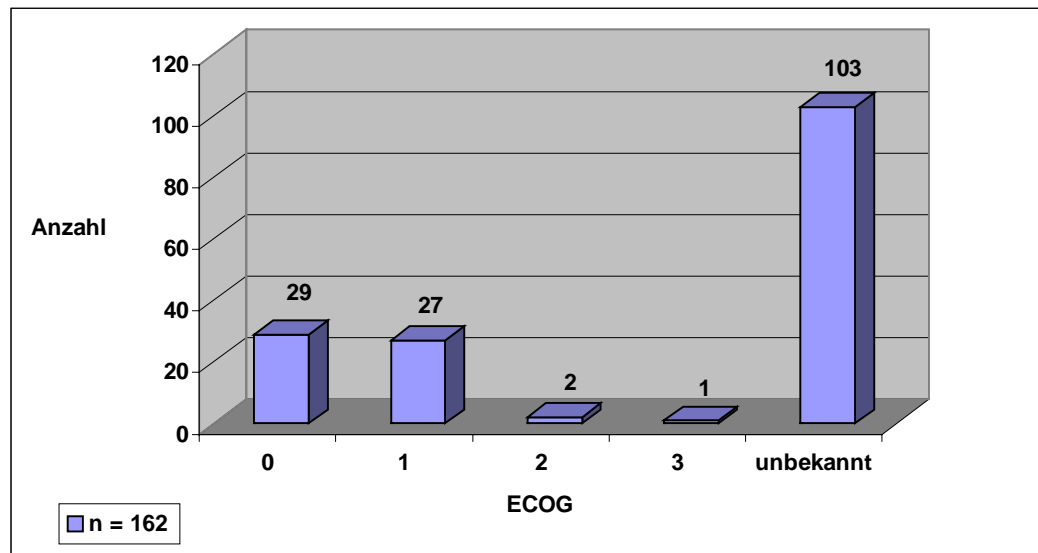
Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit PASW 18 von der Firma IBM. Korrelationen wurden berechnet mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson und dem 2-seitigen Fishers-Exakter-Test. Univariate Überlebensanalyse wurde durchgeführt mittels der Methode nach Kaplan-Meier und der Unterschied der Überlebenskurven wurde mit Hilfe des log-rank-Tests (Mantel-Cox) ermittelt. Korrelationen wurden als signifikant betrachtet, wenn  $p < 0,05$  war.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Statistische Analyse des Ausgangskollektives

#### 4.1.1 Prätherapeutische Behandlungssituation

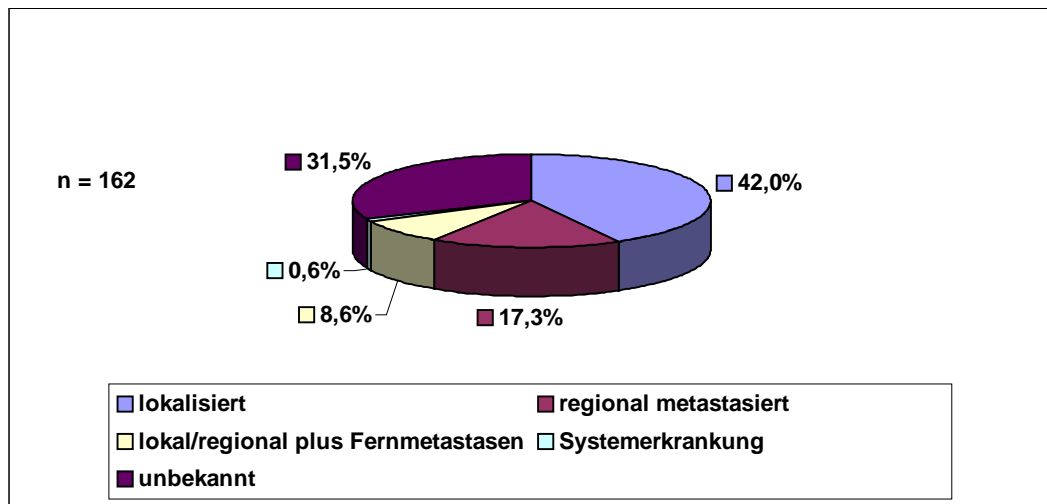
Falls Angaben über den Leistungszustand des Patienten in Form des Karnofsky-Index getroffen wurden, wurden diese Daten in den ECOG (109) übertragen. Insgesamt werden 162 Fälle betrachtet. 34,6% der Patienten befanden sich zu Beginn der Behandlung in einer guten körperlichen Verfassung (ECOG 0-1), während nur 1,8% der Patienten starke körperliche Beschwerden hatten (ECOG 2-3). Bei 63,6% wurde kein Befund bezüglich der gesundheitlichen Verfassung erhoben.



**Abbildung 14: Allgemeiner Leistungszustand der Patienten nach ECOG zu Beginn der Behandlung**

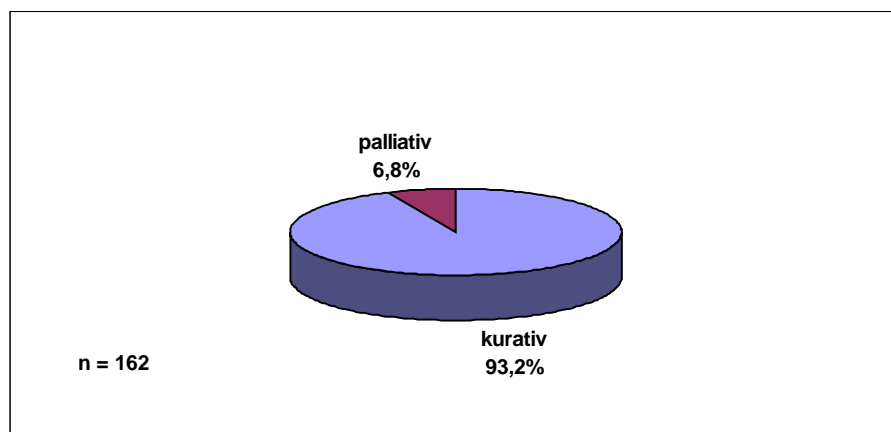
Bei einer großen Anzahl der Fälle, nämlich 68 Patienten (42%), wurde vor der Therapie von einem auf das Ursprungsorgan beschränkten Tumorbefund ausgegangen. 26,5% der Patienten befanden sich in einem fortgeschrittenerem Tumorstadium. Damit ist gemeint, dass prätherapeutisch bei 17,3% der Patienten (28 Fälle) Lymphknotenmetastasen, bei 8,6% der Patienten (14 Fälle) Fernmetastasen und bei einem Patienten vor Therapie bereits mehr als in einem

Organ Metastasen vorhanden waren. In 31,5% der Fälle (51 Patienten) wurde prätherapeutisch keine Aussage über das Tumorstadium getroffen.



**Abbildung 15: Tumorstatus zu Beginn der Behandlung**

Bei 151 Patienten (93,2%) wurde eine kurative Zielsetzung angestrebt und bei 11 Patienten (6,8%) ist von Beginn an von einer palliativen Behandlungssituation ausgegangen worden.



**Abbildung 16: Behandlungsintention zu Beginn der Behandlung**

#### 4.1.2 Tumorlokalisation

49,9% der Tumore waren im linksseitigen Kolon lokalisiert, 6,8% im Querkolon und 35,8% im rechtsseitigen Kolon. In 12 Fällen wurden synchrone Mehrfachtumoren (11 Doppeltumoren, 1 Dreifachtumor) beobachtet. Die meisten Tumore (34 Fälle, 21%) waren im Sigma lokalisiert.

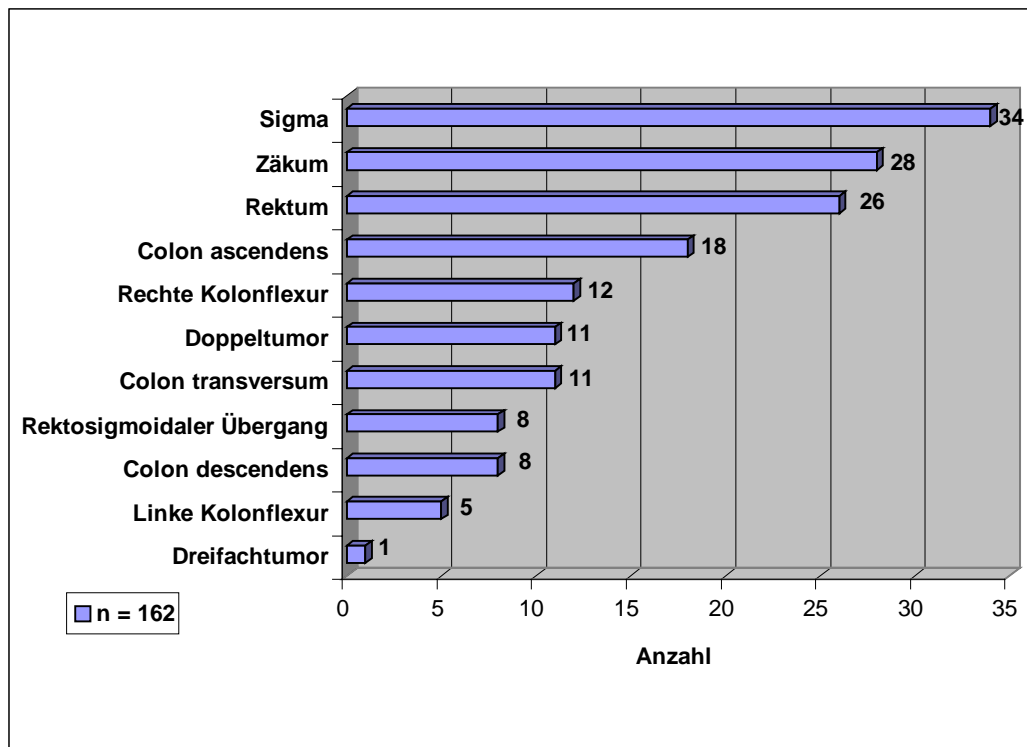


Abbildung 17: Primärtumorlokalisation in absoluten Zahlen

In Abbildung 18a) ist die durchschnittliche Verteilung der KRK, wie sie in der Literatur zu finden ist, in Prozent dargestellt (127). Abbildung 18b) zeigt analog dazu die durchschnittliche Verteilung der KRK im Ausgangskollektiv. Zökum und C.ascendens wurden zusammengefasst.

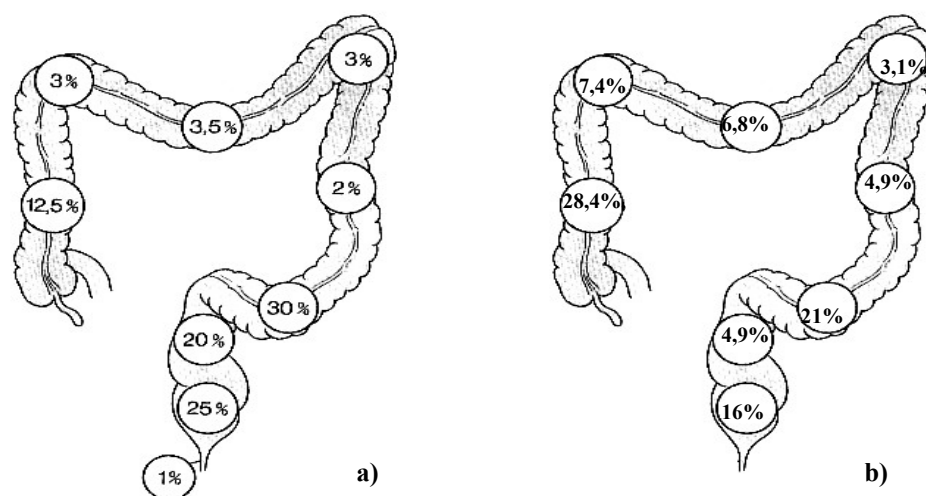


Abbildung 18: Verteilung von KRK im Darm a) in der Bevölkerung (127) und b) im Ausgangskollektiv



In 9,9% der Fälle lagen Metastasen vor. 14 Patienten hatten Lebermetastasen und 2 Patienten Leber- und Lungenfiliae.

Variable	Häufigkeit (n=162)	
	n	%
<b>Metastasen bei Primärdiagnose</b>		
nein	146	90,1
ja	16	9,9
<b>Art der Metastase</b>		
Leber	14	87,5
Leber und Lunge	2	12,5

Tabelle 4-1: Metastasen bei Primärdiagnose und Lokalisation

### 4.1.3 Operation

77,8% der Patienten (126 Fälle) hatten zusätzlich zu ihrer Tumorerkrankung zu Therapiebeginn keine oder nur eine mäßig schwere systemische Krankheit (ASA1-2), welche Auswirkung auf die Operationsfähigkeit gehabt hätte. Eine schwere systemische Krankheit lag bei 33 Patienten (20,4%) vor. Kein Patient befand sich in ASA 4 oder ASA 5. Bei 3 Patienten (1,9%) wurde präoperativ kein ASA-Score erhoben (112).

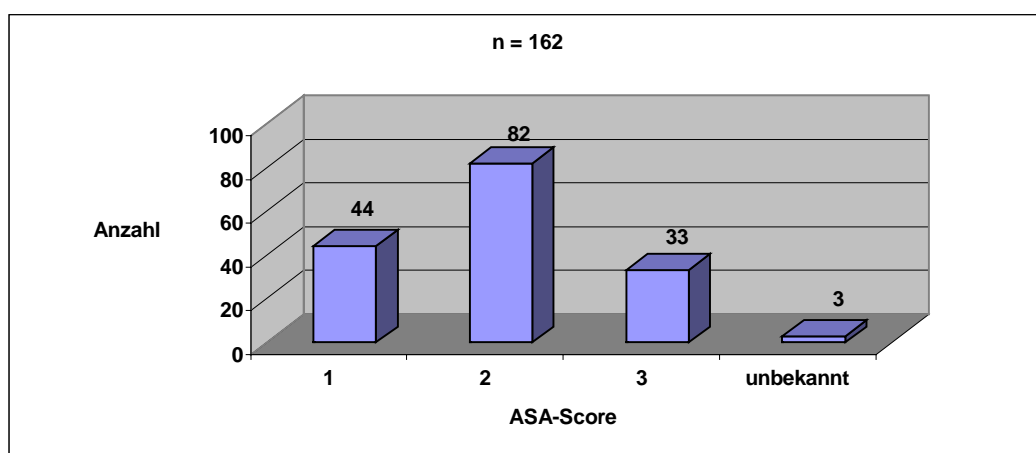


Abbildung 19: ASA-Score im Ausgangskollektiv

In 92,6% der Fälle wurde die Operation mit einer kurativen Zielsetzung durchgeführt. Bei 11 Patienten (6,8%) ist von einer palliativen Situation ausgegangen worden. In einem Fall (0,6%) wurde das KRK bei einer diagnostischen Operation entdeckt.

Variable	Häufigkeit (n=162)	
	n	%
<b>Operationsintention</b>		
diagnostisch	1	0,6
palliativ	11	6,8
kurativ	150	92,6

**Tabelle 4-2: Operationsintention**

In Abbildung 20 und Tabelle 4-3 sind die Häufigkeitsverteilungen der verschiedenen Operationen ersichtlich. Häufig durchgeführte Operationen waren die Hemikolektomie rechts (27,2%), die erweiterte Hemikolektomie rechts (10,5%), die Hemikolektomie links (13%) und die tiefe anteriore Rektumresektion (15,4%).

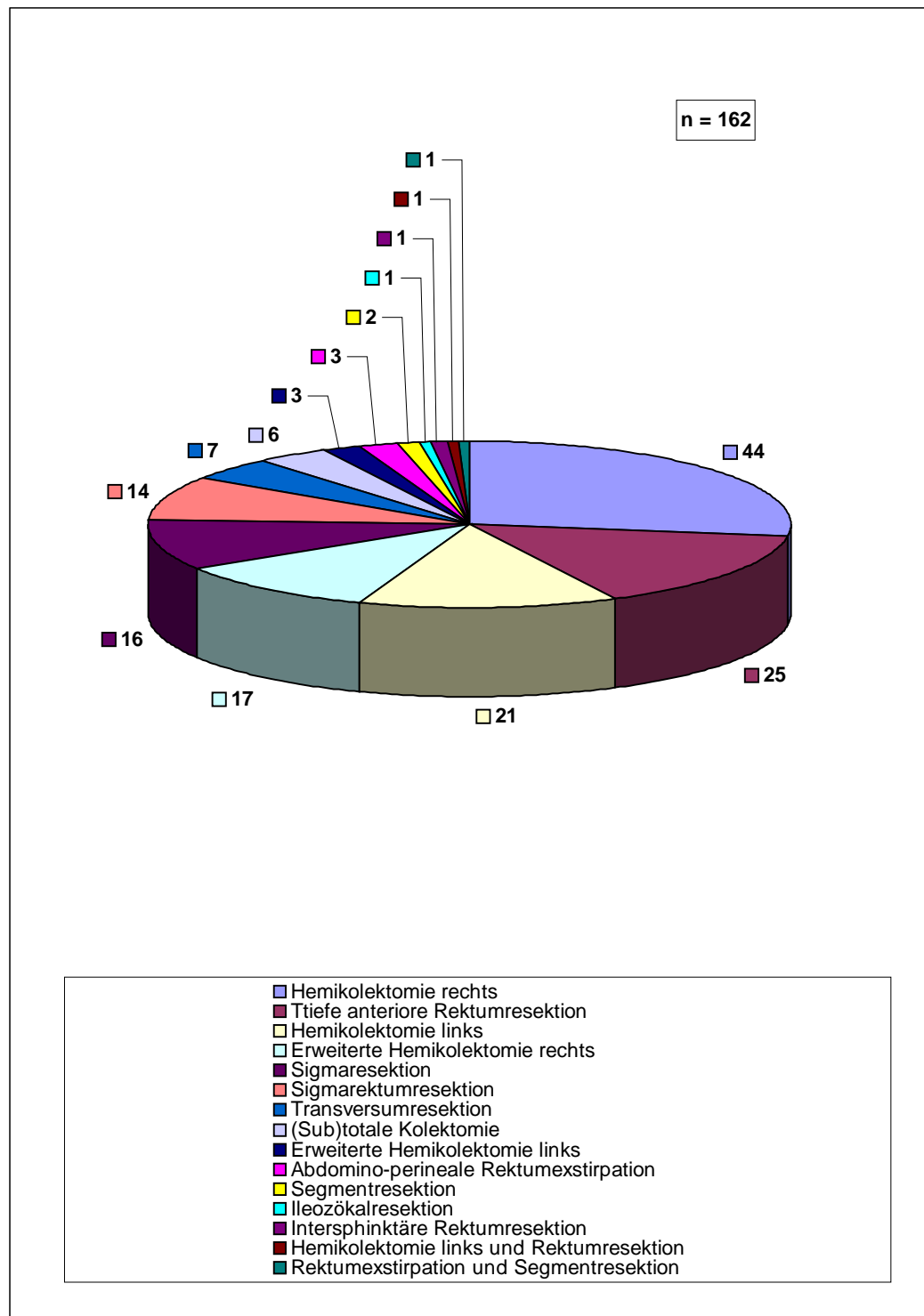
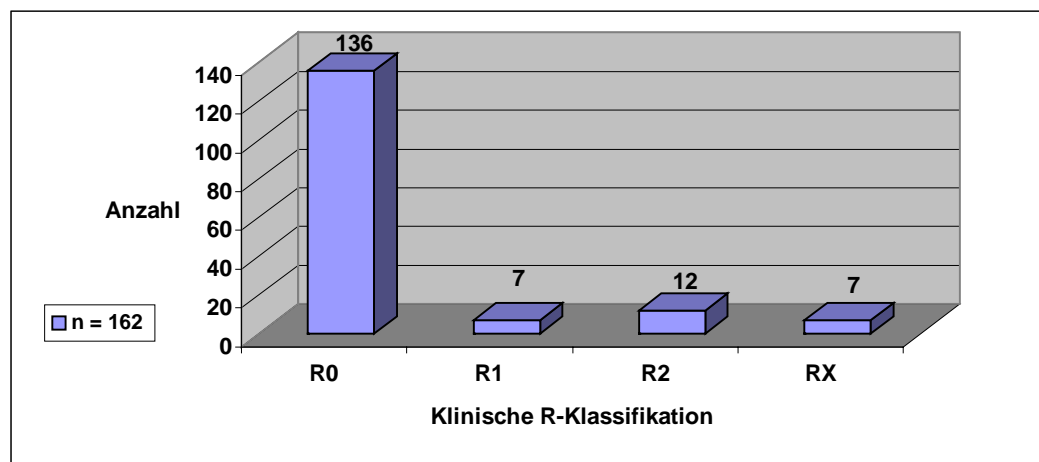


Abbildung 20: Art der Operationen in absoluten Zahlen

Variable	Häufigkeit (n=162)	
	n	%
<b>Art der Operation</b>		
Segmentresektion	2	1,2
Ileozökalresektion	1	0,6
Hemikolektomie rechts	44	27,2
Erweiterte Hemikolektomie rechts	17	10,5
Transversumresektion	7	4,3
Hemikolektomie links	21	13,0
Erweiterte Hemikolektomie links	3	1,9
Sigmaresektion	16	9,9
Sigmarektumresektion	14	8,6
Tiefe anteriore Rektumresektion	25	15,4
Abdomino-perineale Rektumexstirpation	3	1,9
Intersphinktere Rektumresektion	1	0,6
Hemikolektomie links und Rektumresektion	1	0,6
Rektumexstirpation und Segmentresektion	1	0,6
(Sub)totale Kolektomie	6	3,7

Tabelle 4-3: Durchgeführte Operationen

Eine R0-Situation konnte in 84% der Fälle erreicht werden. Bei 12 Operationen (7,4%) wurden ein makroskopisch sichtbarer Tumorrest bzw. Metastasen belassen, sodass eine R2-Situation entstand. In 4,3% der Fälle (7 Tumore) wurde bei der histopathologischen Untersuchung Tumorbefall an der Resektatgrenze (R1) nachgewiesen oder es bestand eine positive Spülzytologie (2 Fälle). Bei all diesen Patienten erfolgte keine Nachresektion. Drei Patienten erhielten eine adjuvante Therapie. Bei drei dieser Fälle ist unsicher, ob eine Chemotherapie durchgeführt wurde. Ein Patient erhielt keine adjuvante Therapie. Bei vier der Patienten mit makroskopisch sichtbarem Tumorrest nach Primäroperation wurde in einer weiteren Operation in demselben Behandlungsabschnitt eine R0-Situation erreicht. Bei einem weiteren Patienten wurde später versucht die Lebermetastasen zu resektieren, aber in dieser Operation konnte nur eine R1-Situation herbeigeführt werden. Die 7 verbleibenden Patienten mit R2-klassifizierten Tumoren wurden im ersten Behandlungsabschnitt nicht mehr chirurgisch behandelt.



**Abbildung 21: Verteilung der klinischen R-Klassifikation**

Der Großteil der Operationen wurde offen (84%), 8,6% laparoskopisch assistiert und 6,2% ausschließlich laparoskopisch durchgeführt. Laparoskopisch und laparoskopisch assistierte Zugänge kamen vor allem in Operationen, die das Sigma und Rektum betrafen, zum Zuge. In Tabelle 4-4 ist die Häufigkeitsverteilung der Operationen mit dem jeweiligen operativen Zugang dargestellt.

Art der Operation	Operativer Zugang				
	offen	laparoskopisch	laparoskopisch assistiert	unbekannt	Gesamt
	n (%)	n (%)	n(%)	n (%)	n (%)
<b>Segmentresektion</b>	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)
<b>Ileozökalresektion</b>	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
<b>Hemikolektomie rechts</b>	41 (93,2%)	1 (2,3%)	1 (2,3%)	1 (2,3%)	44 (100%)
<b>erweiterte Hemikolektomie rechts</b>	17 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	17 (100%)
<b>Transversumresektion</b>	5 (71,4%)	1 (14,3%)	0 (0%)	1 (14,3%)	7 (100%)
<b>Hemikolektomie links</b>	20 (95,2%)	0 (0%)	1 (4,8%)	0 (0%)	21 (100%)
<b>erweiterte Hemikolektomie links</b>	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)
<b>Sigmaresektion</b>	11 (68,8%)	3 (18,8%)	2 (12,5%)	0 (0%)	16 (100%)
<b>Sigmarektumresektion</b>	11 (78,6%)	1 (7,1%)	2 (14,3%)	0 (0%)	14 (100%)
<b>tiefe anteriore Rektumresektion</b>	15 (60%)	4 (16%)	6 (24%)	0 (0%)	25 (100%)
<b>abdomino-perineale Rektumexstirpation</b>	1 (33,3%)	0 (0%)	2 (66,7%)	0 (0%)	3 (100%)
<b>intersphinktere Rektumresektion</b>	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
<b>Hemikolektomie links und Rektumresektion</b>	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
<b>Rektumexstirpation und Segmentresektion</b>	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
<b>(sub)totale Kolektomie</b>	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)
<b>Gesamt</b>	136 (84%)	10 (6,2%)	14 (8,6%)	2 (1,2%)	162 (100%)

Tabelle 4-4: Häufigkeitsverteilung der Art der Operation mit jeweiligem Zugang

#### 4.1.4 Histologie

Der Großteil der Karzinome (82,1%) wurde als Adenokarzinom klassifiziert. 17,3% wurden als muzinöse Adenokarzinome beschrieben. Ein Tumor stellte sich als neuroendokriner Tumor heraus.

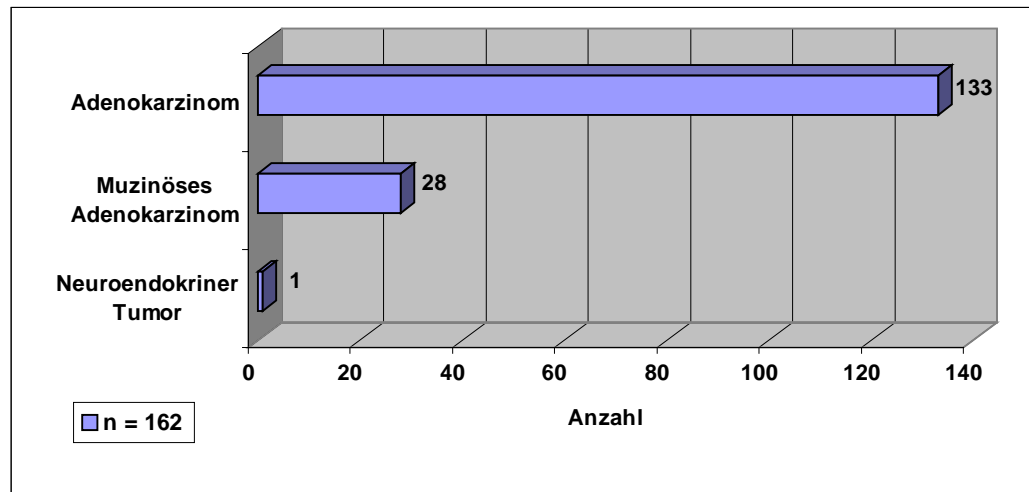


Abbildung 22: Verteilung Tumorentitäten

64,2% der Tumore waren mäßig differenziert (G2), während 35,8% schlecht differenziert (G3) waren. Keiner der Tumore befand sich im G1-Stadium.

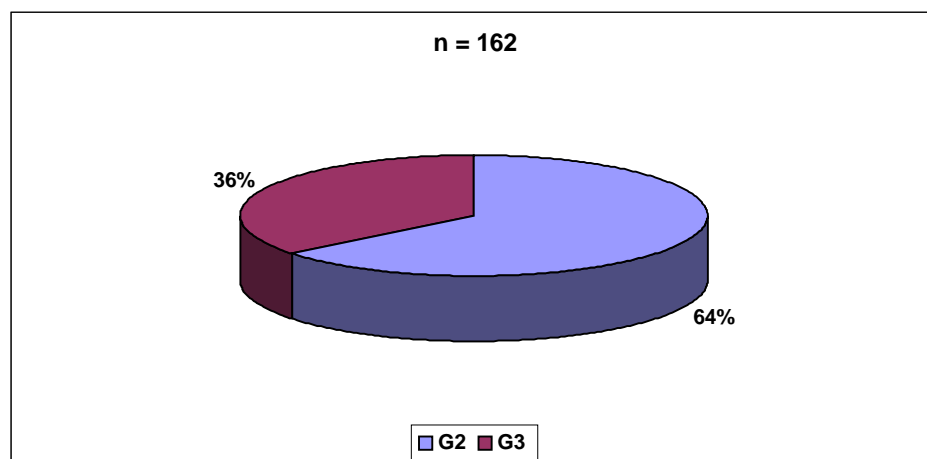


Abbildung 23: Verteilung Grading

Die histopathologische Untersuchung der Resektate ergab bei 66% der Gewebeproben (107 Fälle) ein pT3-Stadium. In 29 Fällen (17,9%) hatte der Tumor bereits Nachbarstrukturen infiltriert (pT4). Bei 15,4% war die Tunica muscularis durchbrochen (pT2). Ein Fall (0,6%) wurde als pT1 klassifiziert.

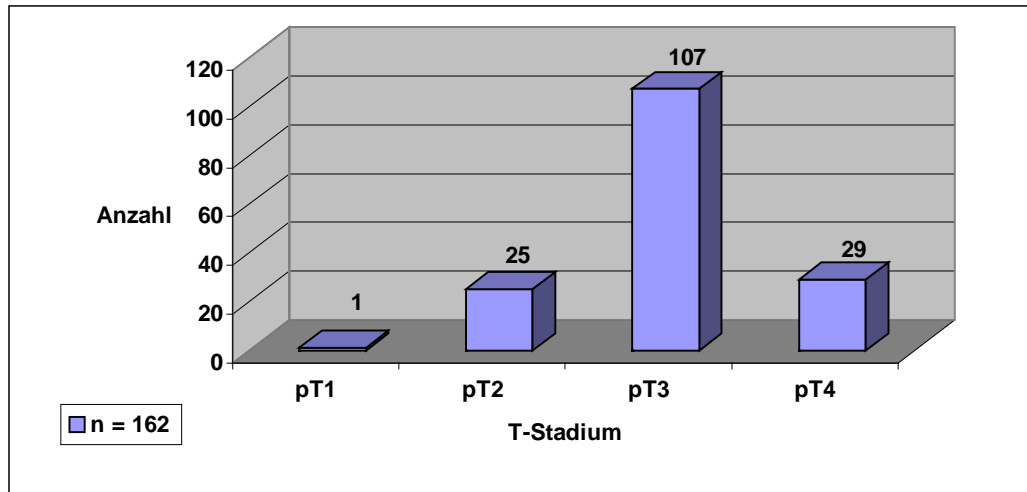


Abbildung 24: Verteilung der Tumorstadien

Mit 45,7% (74 Fällen) lag hauptsächlich pN1 vor, was bedeutet, dass in 1-3 Lymphknoten metastatische Absiedelungen nachgewiesen wurden. In 43 Fällen (26,5%) hatten sich keine Lymphknotenmetastasen gefunden. Bei 45 Tumoren (27,8%) waren mehr als 3 Lymphknoten betroffen.

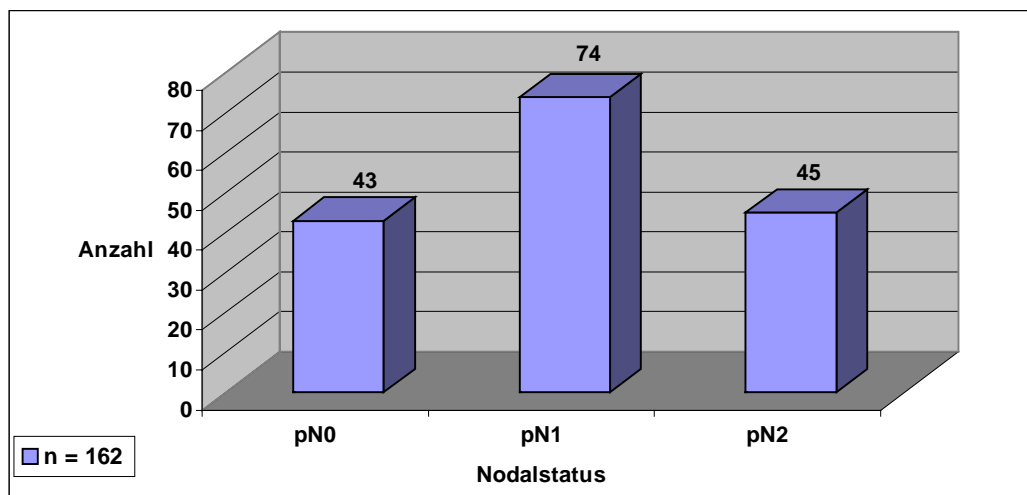


Abbildung 25: Verteilung Nodalstatus



Aus dem T-Stadium, dem Nodalstatus und dem M-Stadium ergibt sich das UICC-Stadium. Das UICC-Stadium 3 ist mit 66,7% am häufigsten vertreten, gefolgt von Stadium 2 mit 16,7%. Das Stadium 4 lag in 9,9% der Fälle vor und das Stadium 1 in 6,85% der Fälle.

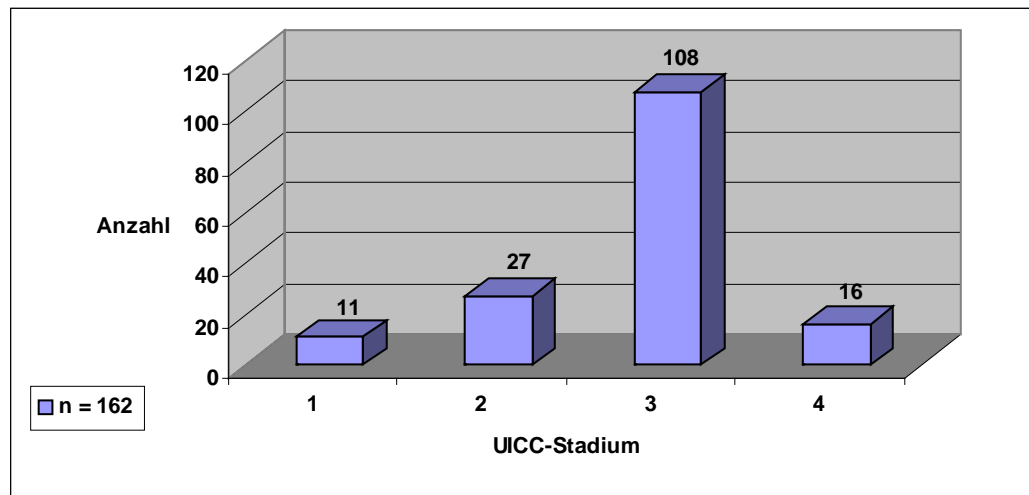


Abbildung 26: Verteilung UICC-Stadien

In 154 Fällen lag eine Beschreibung des Pathologen bezüglich der Tumorkonfiguration vor. Es wurden 21,6% als exophytisch, 3,1% als infiltrativ, 17,9% als ulzerierend und 52,5% als Mischform klassifiziert.

In 39 bzw. 40 Fällen wurde auch der L- und V-Status erhoben. Dabei wurde in 32 Fällen (19,8%) eine Lymphgefäß- und in 25 Fällen (15,4%) eine Veneninvasion gefunden.

Variable	Häufigkeit	
	(n=162)	
	n	%
<b>Tumorkonfiguration</b>		
exophytisch	35	21,6
infiltrativ	5	3,1
ulzerierend	29	17,9
Mischform	85	52,5
unbekannt	8	4,9

<b>L-Status</b>		
<b>L0</b>	7	4,3
<b>L1</b>	32	19,8
<b>unbekannt</b>	123	75,9
<b>V-Status</b>		
<b>V0</b>	15	9,3
<b>V1</b>	25	15,4
<b>unbekannt</b>	122	75,3

Tabelle 4-5: Auflistung der Tumorkonfiguration und des L- und V-Status

### 4.1.5 (Neo-)adjuvante Therapie

#### 4.1.5.1 Neoadjuvante Radiochemotherapie

Vier Patienten erhielten vor der Operation eine kombinierte neoadjuvante Radiochemotherapie. Die durchgeführte Chemotherapie war in allen vier Fällen 5FU-haltig. Zusätzlich zur neoadjuvanten Therapie wurde an dieser Gruppe auch eine adjuvante Chemotherapie (ebenfalls 5FU-haltig), aber keine adjuvante Radiatio durchgeführt.

Bei den neoadjuvant therapierten Patienten handelte es sich ausschließlich um Rektumkarzinompatienten. Eine kurative Zielsetzung wurde bei zwei Patienten angestrebt, während bei den anderen zwei Fällen nur von einer palliativen Behandlungssituation ausgegangen wurde. An einem Patienten wurde eine offene und an zwei Patienten eine laparoskopische tiefe anteriore Rektumresektion durchgeführt. Ein Patient erhielt eine laparoskopisch assistierte abdominoperineale Rektumexstirpation. Je ein Patient befand sich in UICC-Stadium 2 bzw. 4. Bei zwei Patienten waren bereits die regionalen Lymphknoten befallen, aber es lag noch keine Fernmetastasierung vor (UICC-Stadium 3). Drei Tumore der neoadjuvant vorbehandelten Patienten waren G2 und ein Tumor G3 differenziert. Ein Patient dieser Gruppe war im Beobachtungszeitraum der Studie verstorben.

#### 4.1.5.2 Adjuvante Radiochemotherapie und adjuvante Radiotherapie

In fünf Fällen (3,1%) wurde eine kombinierte adjuvante Radiochemotherapie durchgeführt. Wie bei der neoadjuvanten Radiochemotherapie handelte es sich bei diesen Fällen ebenfalls um Rektumkarzinompatienten bzw. einem Patienten mit Tumorbefall des rektosigmoidalen Überganges. Die Chemotherapie wurde in allen Fällen mit 5FU und Folinsäure durchgeführt.

In einem Fall (0,6%) war eine kombinierte Radiochemotherapie zwar geplant, aber es wurde nur eine Radiatio ohne Chemotherapie durchgeführt. Auch hierbei handelte es sich um einen Patienten mit Rektumkarzinom.

#### 4.1.5.3 Adjuvante Chemotherapie

Im Ausgangskollektiv wurden 58,7% der Patienten adjuvant chemotherapeutisch behandelt. Insgesamt erhielten davon 92,6% eine 5FU-haltige Chemotherapie, welche in allen Fällen zusammen mit Folinsäure verabreicht wurde. In 16 Fällen wurde die 5FU-Therapie mit weiteren Chemotherapeutika kombiniert. Diese Medikamente waren Levamisole, Oxaliplatin, Irinotecan und Panorex. Panorex und Capecitabine wurden in 4 bzw. 3 Fällen ohne 5FU zur chemotherapeutischen Behandlung eingesetzt.

Variable	Häufigkeit	
	n	%
<b>Adjuvante Chemotherapie</b>	<b>(n= 162)</b>	
nein	67	41,4
ja	90	55,6
kombinierte adjuvante Radiochemotherapie	5	3,1
<b>Adjuvante Chemotherapie mit 5FU</b>	<b>(n=95)</b>	
keine 5FU-haltige Chemotherapie	7	7,4
5FU und Folinsäure	65	68,4
5FU und anderen Substanzen	18	18,9
5FU mit Radiatio	5	5,3

Adjuvante Chemotherapie mit anderen Substanzen (n=95)		
Levamisole	10	10,5
Oxaliplatin	3	3,2
Irinotecan	2	2,1
Capecitabine	3	3,2
Panorex	5	5,3

Tabelle 4-6: Auflistung der verabreichten Chemotherapeutika

#### 4.1.5.4 Verteilung der neoadjuvanten und adjuvanten Therapieformen

Insgesamt erhielten 96 Patienten - zusätzlich zur Operation - weitere Behandlungen des Tumors. Davon erhielten vier Patienten eine neoadjuvante Radiochemotherapie und eine adjuvante Chemotherapie. Insgesamt wurden 90 Patienten adjuvant chemotherapiert. In dieser Zahl sind auch die bereits neoadjuvant vorbehandelten Patienten mit eingeschlossen. Adjuvant radiochemotherapiert wurden 5 Patienten und in einem Fall wurde ausschließlich eine adjuvante Radiotherapie durchgeführt. Die häufigste zusätzlich durchgeführte Therapieform war somit die adjuvante Chemotherapie mit 93,8%.

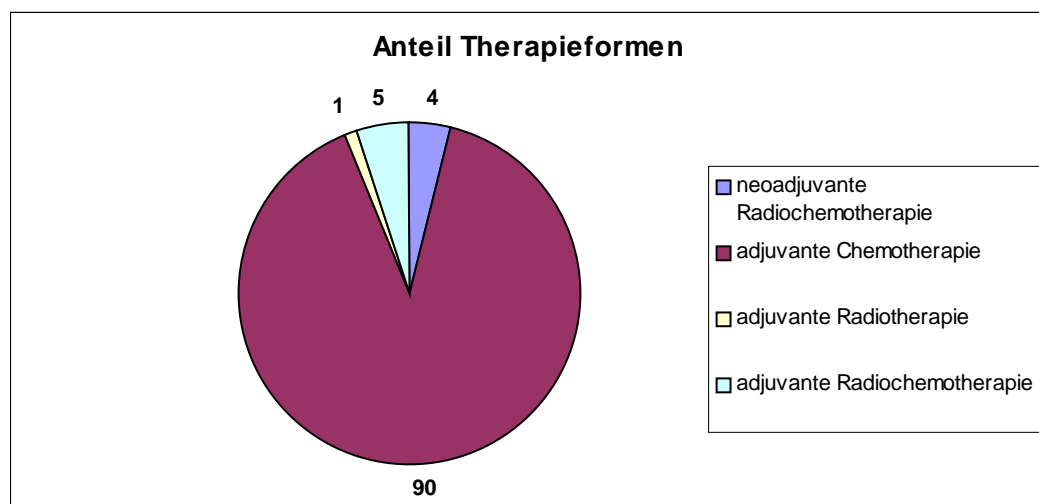


Abbildung 27: Anzahl der Fälle mit neoadjuvanter Radiochemotherapie, adjuvanter Chemotherapie, adjuvanter Radiotherapie und adjuvanter Radiochemotherapie

#### 4.1.5.5 Chemotherapie in den verschiedenen UICC-Stadien

Im UICC-Stadium 3 wurden 86,5% und im Stadium 4 93,8% der Patienten chemotherapeutisch behandelt. Im Stadium 2 erhielten noch 22,2% der Patienten Chemotherapie. Kein Patient wurde hingegen im UICC-Stadium 1 neoadjuvant oder adjuvant chemotherapiert.

UICC-Stadium	Chemotherapie (n=162)		
	ja	nein	Gesamt
1	0 (0%)	11 (100%)	11 (100%)
2	6 (22,2%)	21 (77,8%)	27 (100%)
3	74 (68,5%)	34 (31,5%)	108 (100%)
4	15 (93,8%)	1 (6,3%)	16 (100%)

Tabelle 4-7: Verteilung der chemotherapeutischen Behandlung auf die UICC-Stadien

#### 4.1.6 CEA-Werte

##### 4.1.6.1 Prätherapeutische CEA-Werte

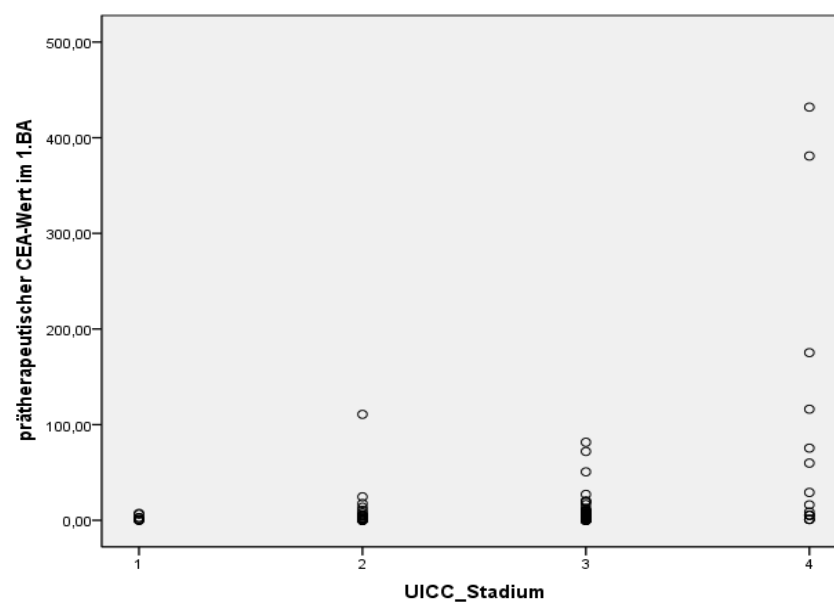
Von 130 Patienten wurde zu Beginn der Behandlung ein CEA-Wert erhoben. Hierbei ergab sich ein Mittelwert von 16,228 ng/ml und ein Median von 2,72 ng/ml. Das Minimum betrug 0,0 ng/ml und das Maximum 432,00 ng/ml.

In Tabelle 4-8 ist dargestellt, in welchem Ausmaß das UICC-Stadium mit der Höhe des prätherapeutischen CEA-Wertes zusammenhängt. Es ist zu sehen, dass im UICC-Stadium 1 alle Fälle CEA-Werte <10ng/ml aufwiesen. Im UICC-Stadium 2 und 3 sind vereinzelt höhere CEA-Werte zu sehen. Der Großteil der Fälle im UICC-Stadium 4 (53,4%) liegt über 15ng/ml. Nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergibt sich eine Signifikanz für diesen Zusammenhang von  $p=0,014$ .

Variable	UICC-Stadium				
	1	2	3	4	Gesamt
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n
<b>prätherapeutische CEA-Werte in ng/ml</b>					
<b>0-5</b>	6 (75%)	17 (68%)	53 (64,6%)	3 (20%)	79
<b>5,1-10</b>	2 (25%)	3 (12%)	19 (23,2%)	4 (26,7%)	28
<b>10,1-15</b>	0 (0%)	2 (8%)	2 (2,4%)	0 (0%)	4
<b>15,1-20</b>	0 (0%)	1 (4%)	3 (3,7%)	1 (6,7%)	5
<b>20,1-25</b>	0 (0%)	1 (4%)	1 (1,2%)	0 (0%)	2
<b>25,1-30</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,2%)	1 (6,7%)	2
<b>50,1-60</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,2%)	1 (6,7%)	2
<b>&gt;60,1</b>	0 (0%)	1 (4%)	2 (2,4%)	5 (33,3)	8
<b>Gesamt</b>	8 (100%)	25 (100%)	82 (100%)	15 (100%)	130

**Tabelle 4-8: Verteilung der prätherapeutischen CEA-Werte auf die UICC-Stadien**

In Abbildung 28 ist die Verteilung der Höhe der prätherapeutischen CEA-Werte innerhalb der verschiedenen UICC-Stadien graphisch dargestellt.



**Abbildung 28: Verteilung der prätherapeutischen CEA-Werte auf die UICC-Stadien**

#### 4.1.6.2 Verlauf der CEA-Werte

Als posttherapeutische CEA-Werte gingen die CEA-Werte in die Berechnung ein, welche nach der Primäroperation oder nach einer adjuvanten Therapie erhoben wurden. In Fällen, in denen mehrere CEA-Werte vorlagen, wurde der zuletzt erhobene Wert im ersten Behandlungsabschnitt verwendet. Es konnte in 71 Fällen ein posttherapeutischer CEA-Wert ermittelt werden. Der Mittelwert betrug 5,2123 ng/ml und der Median 2,72 ng/ml. Das Minimum lag - wie auch beim prätherapeutischen CEA-Wert - bei 0,0 ng/ml und das Maximum reduzierte sich auf 140,7 ng/ml.

Von 60 Patienten lag ein prä- und ein posttherapeutischer CEA-Wert vor. Bei diesen Fällen konnte der Verlauf der CEA-Werte beobachtet werden. In 51 Fällen (85%) lag der posttherapeutische CEA-Wert unter 5 ng/ml und war damit laut Definition im Normbereich. Bei 6 dieser Fälle (10%) wurde ein CEA-Wert von unter 15 ng/ml festgestellt. 3 Patienten (5%) zeigten posttherapeutisch signifikant erhöhte CEA-Werte. Zur graphischen Darstellung des Verlaufes der CEA-Werte ist in Abbildung 29 und 30 ein Boxplot zu sehen. Abbildung 30 ist eine Detailansicht des Hauptfeldes von Abbildung 29, um den Verlauf besser herauszuarbeiten. In diese Darstellung gingen nur Fälle ein, von denen ein prä- und ein posttherapeutischer CEA-Wert vorlag.

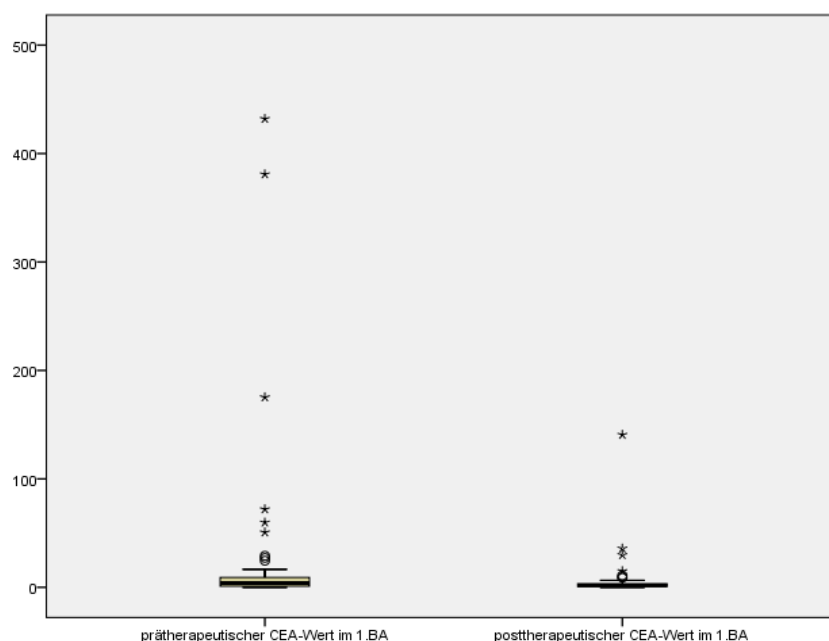


Abbildung 29: Boxplot zum Verlauf der CEA-Werte vor und nach Therapie

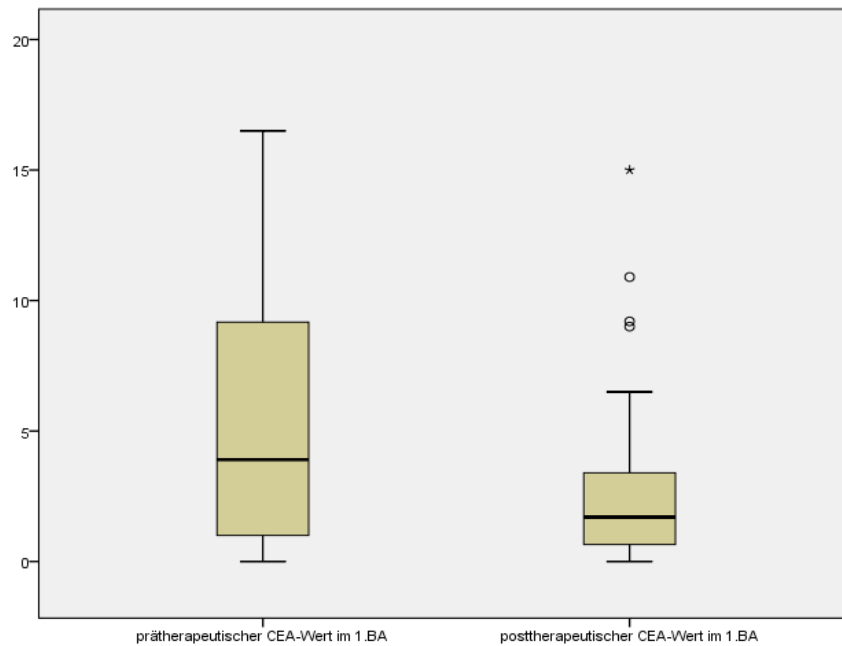


Abbildung 30: Ausschnitt aus Abbildung 29; Verlauf CEA-Werte

#### 4.1.7 Rezidive

48 Patienten (29,6%) erlitten ein Rezidiv. 114 Patienten (70,4%) blieben im Beobachtungszeitraum rezidivfrei.

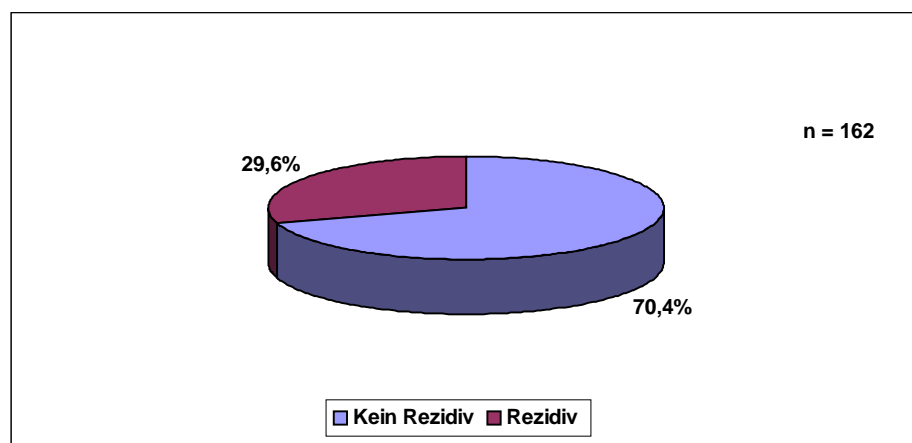


Abbildung 31: Rezidivverteilung

Dabei handelte es sich bei zwei Patienten (4,2%) um einen lokalisierten Befund, also auf das Ursprungsorgan begrenzt. In 20,8% der Rezidive wurden neben einem Lokalrezidiv Fernmetastasen gefunden. Im Großteil der Fälle (62,5%) wurden Fernmetastasen diagnostiziert. Bei 2 Patienten (4,2%) wurden in mehr als zwei Organen Metastasen gefunden, was hier als Systemerkrankung definiert



wird. Keine Informationen über den genauen Tumorstatus zum Zeitpunkt des Rezidives lagen bei 5 Patienten (10,4%) vor.

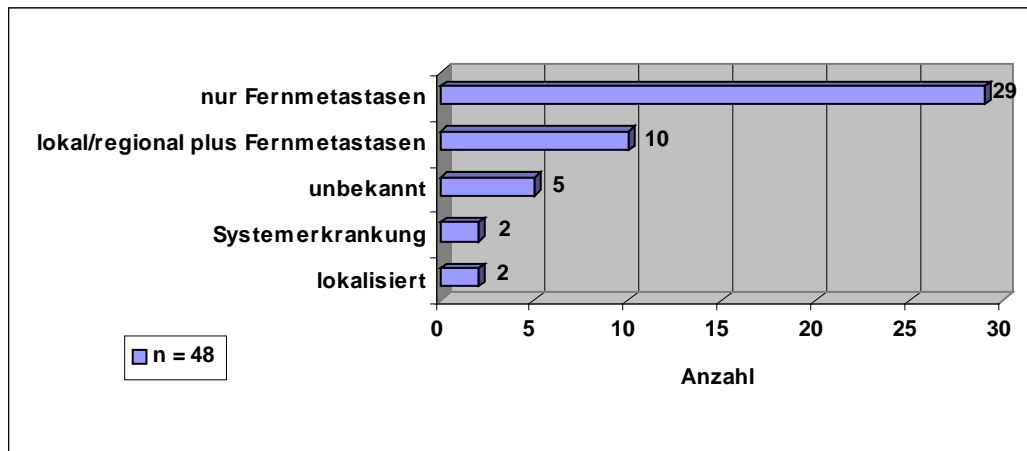


Abbildung 32: Tumorstatus zum Zeitpunkt des Rezidiv

Die Leber war das vorrangige Ziel der Metastasierung (47,7%). Auch im Peritoneum (13,6%), der Lunge (9,1%), dem Hirn (2,3%) und nichtregionalen Lymphknoten (4,5%) wurden Metastasen gefunden. In 18,2% waren zwei Organe zeitgleich von Metastasen befallen. Der Anteil an Systemerkrankungen an der Metastasierung betrug 4,5%.

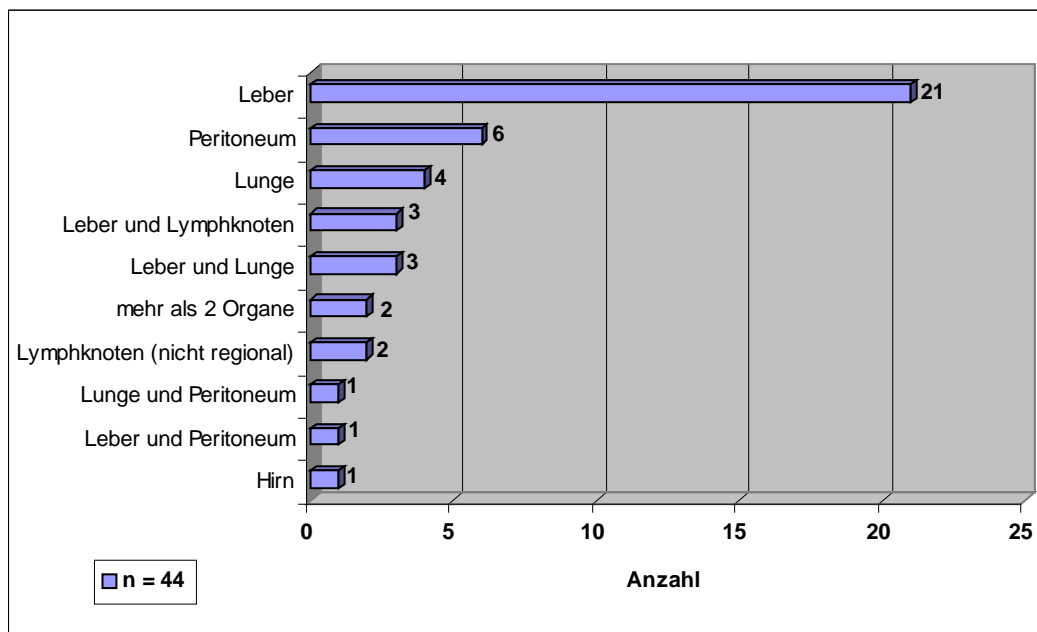


Abbildung 33: Metastasenlokalisation bei Rezidiv

### 4.1.8 Rezidivfreies Überleben

In 139 Fällen lagen Daten zur Berechnung des rezidivfreien Survival vor. Hierfür wurde der Zeitraum von der Erstdiagnose bis zur Diagnose des Rezidivs bzw. einem Progress der Erkrankung ermittelt. Auch der Tod des Patienten wurde als Rezidiv gewertet. Zweitmalignome gingen nicht in die Berechnung ein. Der mediane Beobachtungszeitraum betrug 35 Monate (0-140 Monate). Die nachfolgenden Überlebenskurven beziehen sich auf diese 139 Patienten. Die Begriffe Rezidiv und Ereignis werden in diesem Abschnitt als Überbegriff für ein Lokalrezidiv, Fernmetastasen, Progress der Erkrankung oder Tod des Patienten benutzt.

#### 4.1.8.1 Rezidivfreies Überleben und UICC-Stadium

Abbildung 34 zeigt die Überlebenskurven in den jeweiligen UICC-Stadien 1-4. Die insgesamt sieben Patienten im Stadium 1 hatten kein Ereignis im Beobachtungszeitraum aufzuweisen. Im Stadium 2 überlebten von 16 Patienten nur noch 75% rezidivfrei. Von 102 Patienten im Stadium 3 überlebten 53,9% rezidivfrei. Im Stadium 4 wurde mit 11 Ereignissen bei insgesamt 14 Fällen die geringste Fallzahl der Patienten (21,4%) verzeichnet, die rezidivfrei überlebten. Der Unterschied im rezidivfreien Überleben in den verschiedenen UICC-Stadien war statistisch signifikant mit  $p=0,001$ .

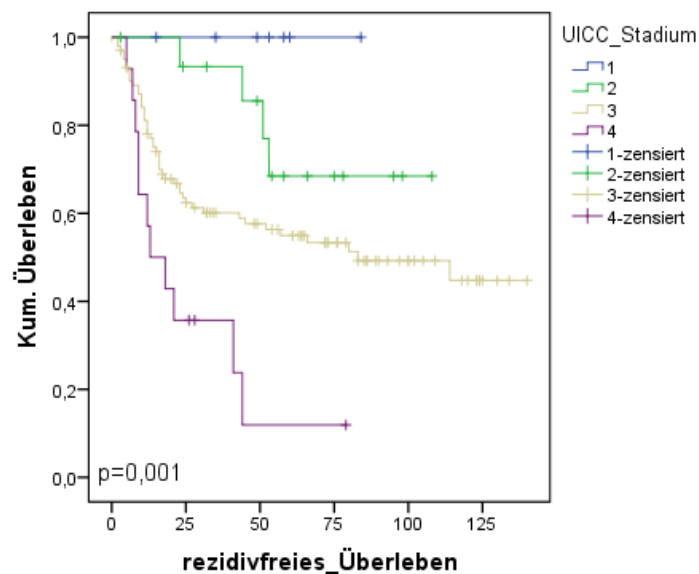


Abbildung 34: Rezidivfreies Überleben in UICC-Stadium 1-4

#### 4.1.8.2 Rezidivfreies Überleben und Grading

Das mittlere rezidivfreie Überleben der Patienten mit G2 differenzierten Tumoren betrug 76,32 Monate und der G3-Tumore 84,59 Monate. Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,655$ ) im rezidivfreien Überleben.

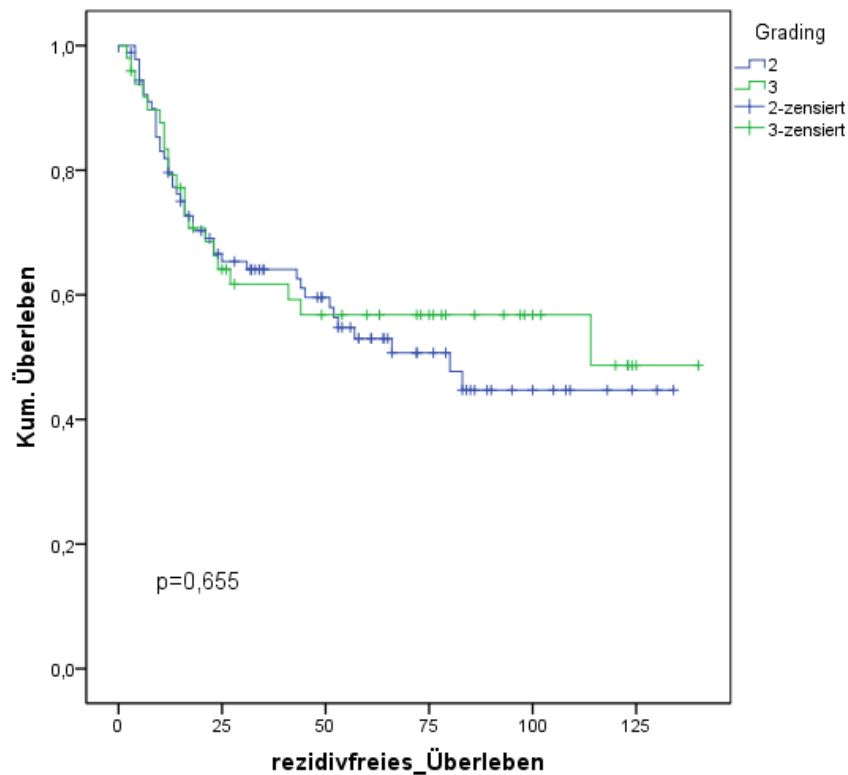


Abbildung 35: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von Grading

#### 4.1.8.3 Rezidivfreies Überleben und R-Klassifizierung

Patienten, bei denen die gesamte Tumormasse durch eine Operation nicht entfernt werden konnte, hatten ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben ( $p=0,003$ ). Patienten mit einem makroskopisch sichtbaren Tumorrest (R2) hatten ein mittleres rezidivfreies Überleben von 26,06 Monaten. Die Patienten mit mikroskopisch nachgewiesenem Befall der Resektatgrenzen überlebten im Mittel 64,17 Monate rezidivfrei. Die längste mittlere Rezidivfreiheit mit 86,75 Monaten konnte bei den Patienten verzeichnet werden, denen die gesamte Tumormasse bei der Primäroperation entfernt wurde. Fälle mit unbekannter R-Klassifizierung ( $n=6$ ) wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt.

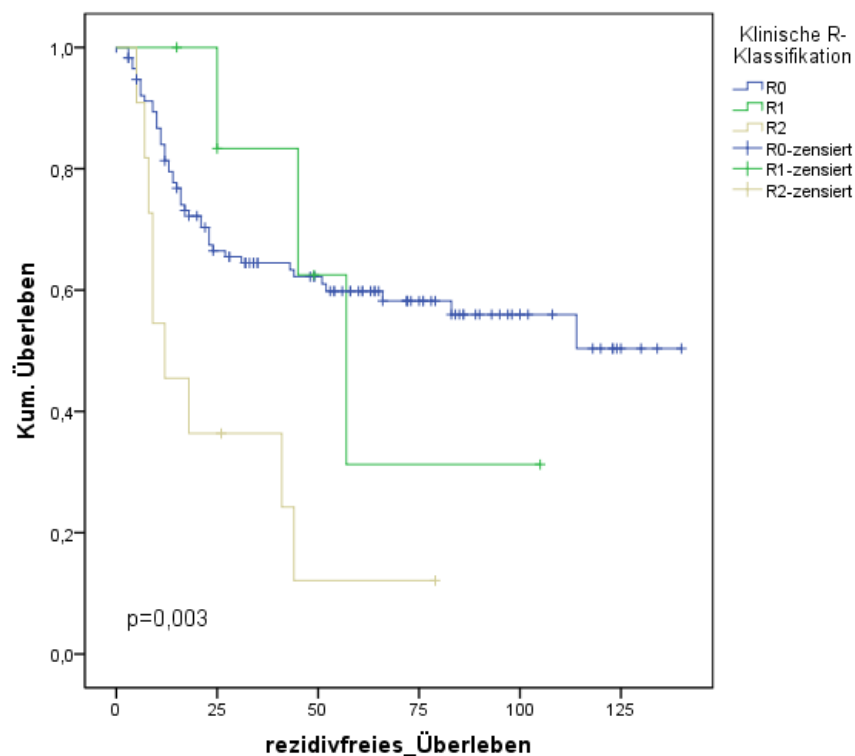


Abbildung 36: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit der R-Klassifizierung

#### 4.1.8.4 Rezidivfreies Überleben und Lymphgefäßinfiltration

Insgesamt wurde in 31 Fällen der L-Status erhoben, von denen auch ein rezidivfreier Überlebenszeitraum ermittelt werden konnte. Davon wurden 27 Tumore mit L1 befundet und in vier Fällen wurde eine Lymphgefäßinvasion ausgeschlossen. Die L0-Gruppe wies ein mittleres rezidivfreies Überleben von 114 Monaten, die L1-Gruppe von 54,93 Monaten auf. Es wurden 16 Ereignisse in der L1-Gruppe verzeichnet, womit 59,3% Patienten dieser Gruppe ein Rezidiv erlitten. In der L0-Gruppe wurde nur ein einziges Ereignis gemeldet, sodass 75% der Patienten dieser Gruppe als rezidivfrei gelten. Es wurde keine signifikante Korrelation des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von Lymphgefäßinfiltration gefunden ( $p=0,232$ ).

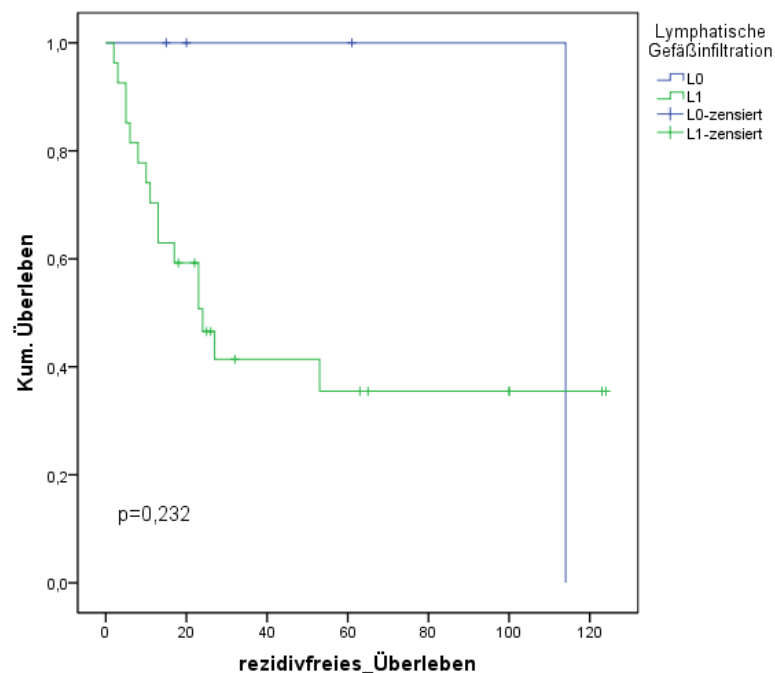


Abbildung 37: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der Lymphgefäßinfiltration

#### 4.1.8.5 Rezidivfreies Überleben und Blutgefäßinfiltration

Von den Fällen, die zur Berechnung des rezidivfreien Überlebens berücksichtigt werden, wurde der V-Status bei 34 Tumoren erhoben. 24 Fälle zeigten eine positive, 10 eine negative Gefäßinfiltration. In der negativen Gruppe wurden 3 Ereignisse beobachtet, womit 70% der Patienten rezidivfrei blieben. Die V1-Gruppe verzeichnete 15 Ereignisse, was bedeutet, dass 62,5% der Patienten ein Rezidiv erlitten. Das mittlere rezidivfreie Überleben betrug in der V0-Gruppe 92,4 Monate und in der V1-Gruppe 52,56 Monate. Auch dieser Zusammenhang gilt als nicht statistisch signifikant ( $p=0,140$ ).

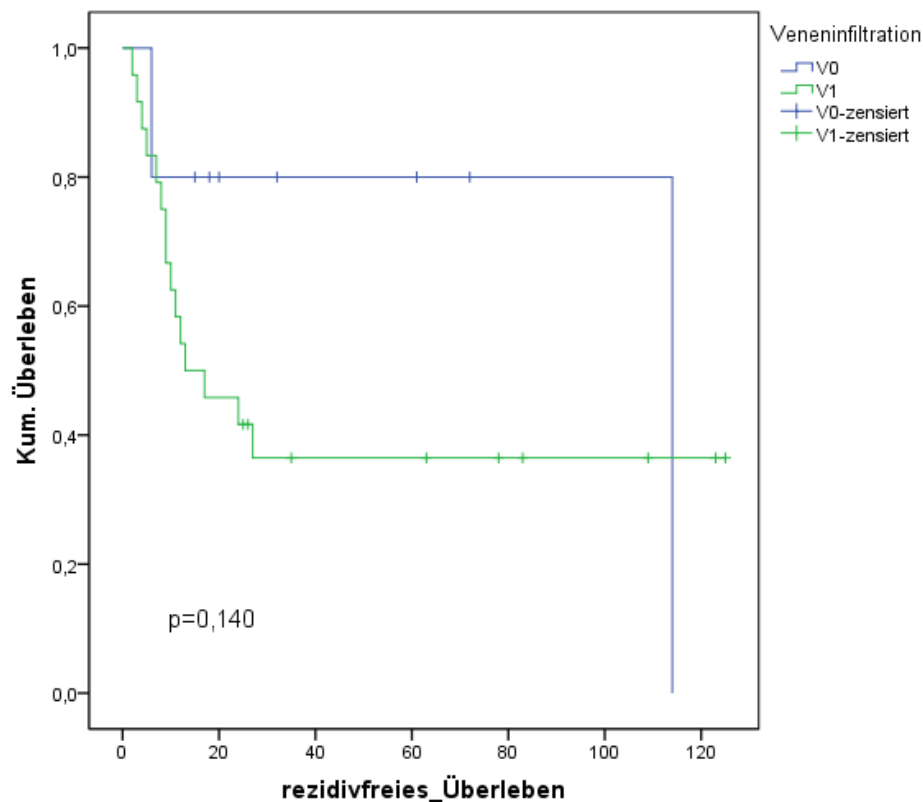


Abbildung 38: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der Blutgefäßinfiltration

#### 4.1.9 Overall Survival

Von den insgesamt 162 Patienten wurde bei 48 Patienten (29,6%) ein Todesdatum gemeldet.

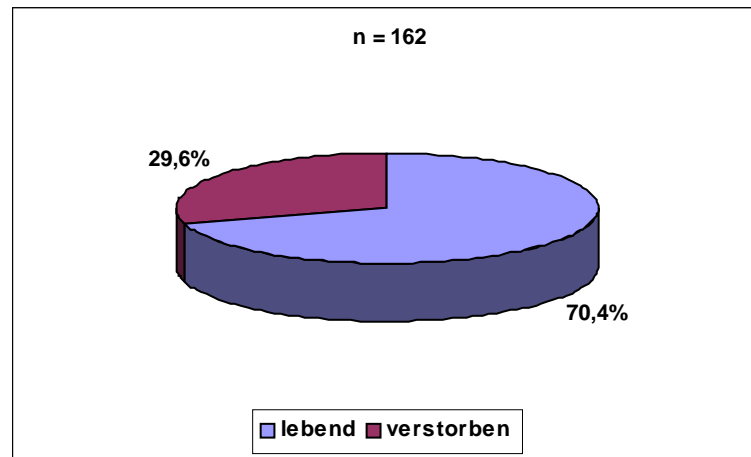


Abbildung 39: Survival-Status

In 11 Fällen (22,9%) war der Tod eindeutig auf die Tumorerkrankung zurückzuführen. Bei 58,3% (28 Fälle) war eine tumorbedingte Todesursache wahrscheinlich, konnte aber nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ein Patient (2,1%) verstarb an Komplikationen der Behandlung. Eine tumorbedingte Todesursache konnte bei zwei Patienten (4,2%) ausgeschlossen werden. In 6 Fällen (58,3%) konnte keine Todesursache in Erfahrung gebracht werden.

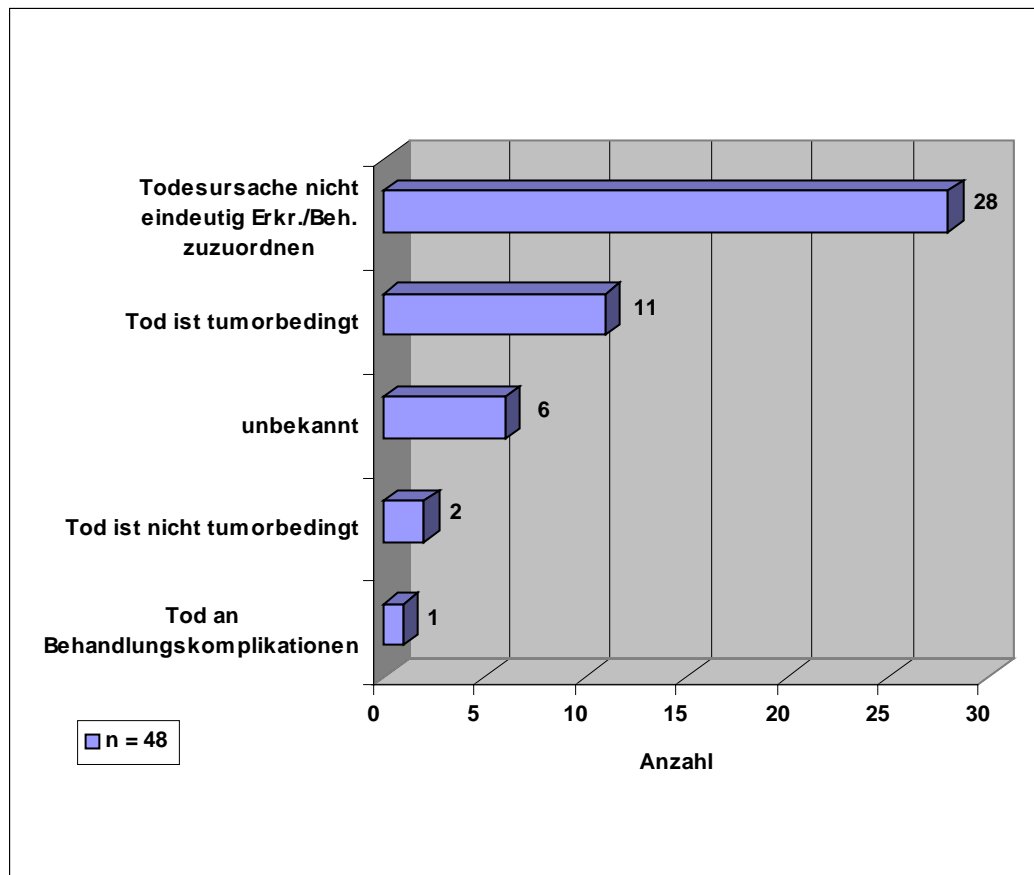


Abbildung 40: Todesursachen

Von den verbleibenden 114 lebenden Patienten (70,4%) ging das letzte bekannte Untersuchungs- bzw. Therapiedatum zur Berechnung des Overall Survivals ein. Insgesamt konnte so von 139 Patienten des Ausgangskollektives ein Überlebenszeitraum ermittelt werden. Das mediane Follow-up beträgt 45 Monate (0-140 Monate).



#### 4.1.9.1 Overall Survival und UICC-Stadium

Im UICC-Stadium1 war unter den 7 Patienten kein Todesfall zu ermitteln. Von 16 Fällen im Stadium 2 starben zwei Patienten. Die Fälle im Stadium 3 zeigen im Beobachtungszeitraum eine Überlebensquote von 61,8% auf (39 Todesfälle bei 102 Patienten). Die Hälfte der Patienten im UICC-Stadium 4 ist verstorben (7 Todesfälle bei 14 Patienten). Es besteht eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Verläufen der verschiedenen Überlebenskurven in den jeweiligen UICC-Stadien ( $p=0,036$ ).

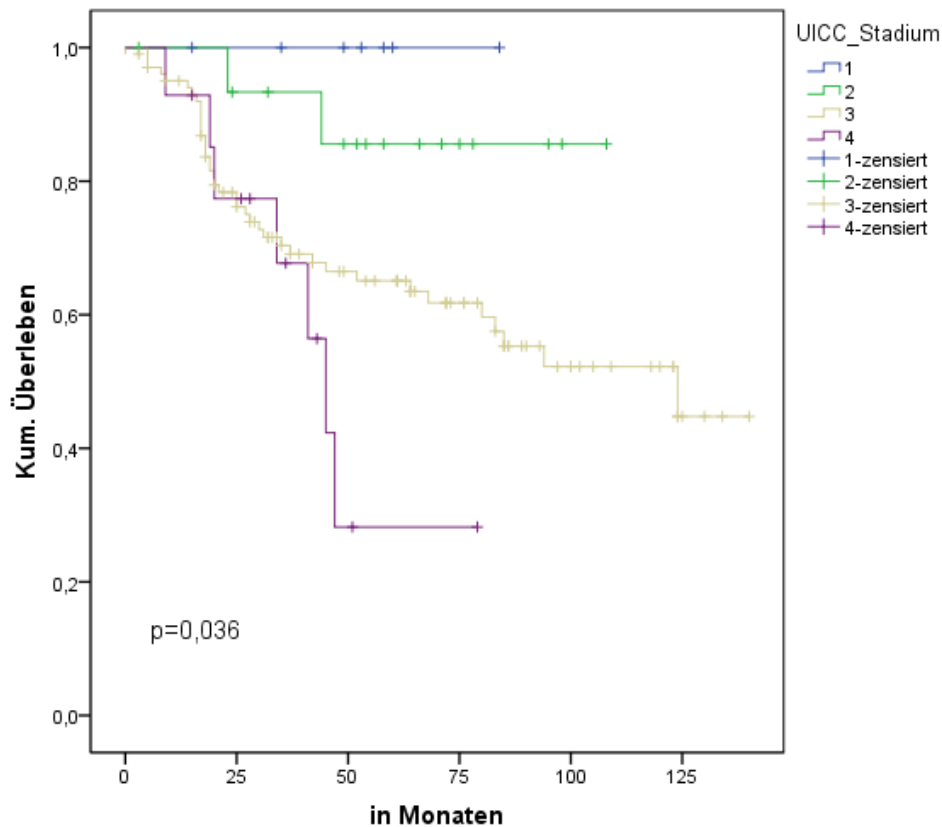


Abbildung 41: Overall Survival in Abhängigkeit vom UICC-Stadium

#### 4.1.9.2 Overall Survival and Grading

Das mittlere Überleben der Patienten im G2- oder G3-Stadium unterscheidet sich nicht signifikant. Patienten mit G2 differenzierten Tumoren lebten im Mittel 92,249 Monate und bei G3 differenzierten Tumoren lag die mittlere Überlebenszeit mit 88,660 Monaten nur knapp darunter. Der p-Wert betrug 0,472.

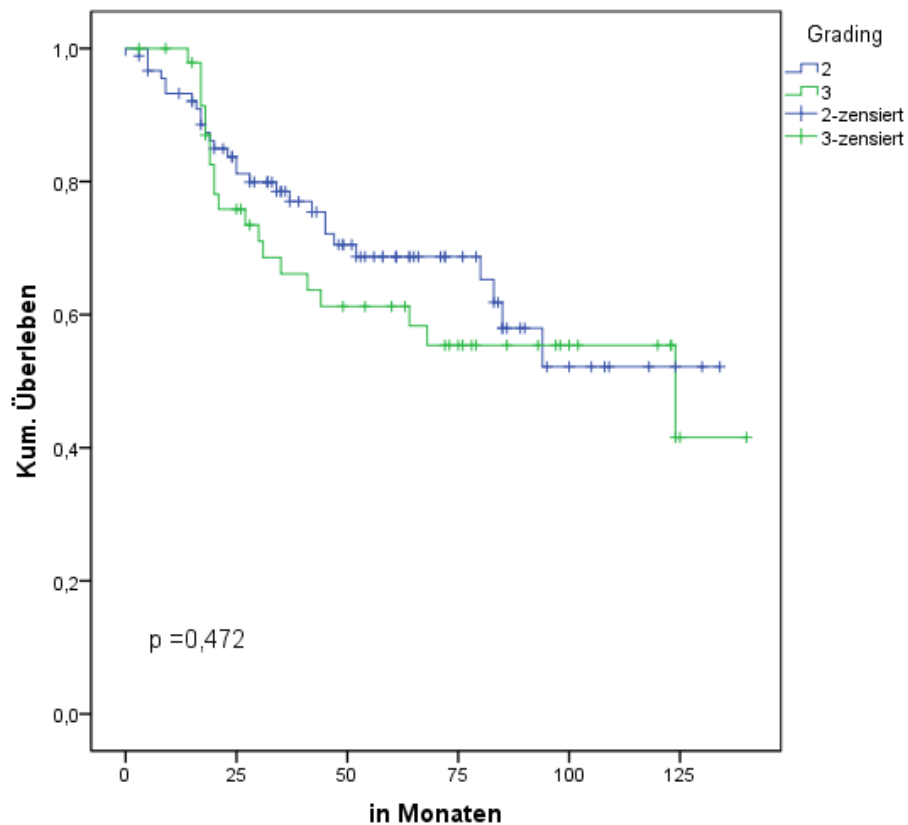


Abbildung 42: Overall Survival in Abhängigkeit des Gratings

#### 4.1.9.3 Overall Survival und Rezidivstatus

Recht eindrucksvoll unterscheiden sich die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier bei Patienten mit und ohne Rezidiv ( $p=0,000$ ). Patienten, die kein Rezidiv erlitten, überlebten im Mittel 118,951 Monate, während Patienten mit Rezidiv nur 47,225 Monate überlebten. 84,6% der rezidivfreien Patienten sind noch am Leben. Bei den Patienten mit Rezidiv sind es nur noch 29,2%.

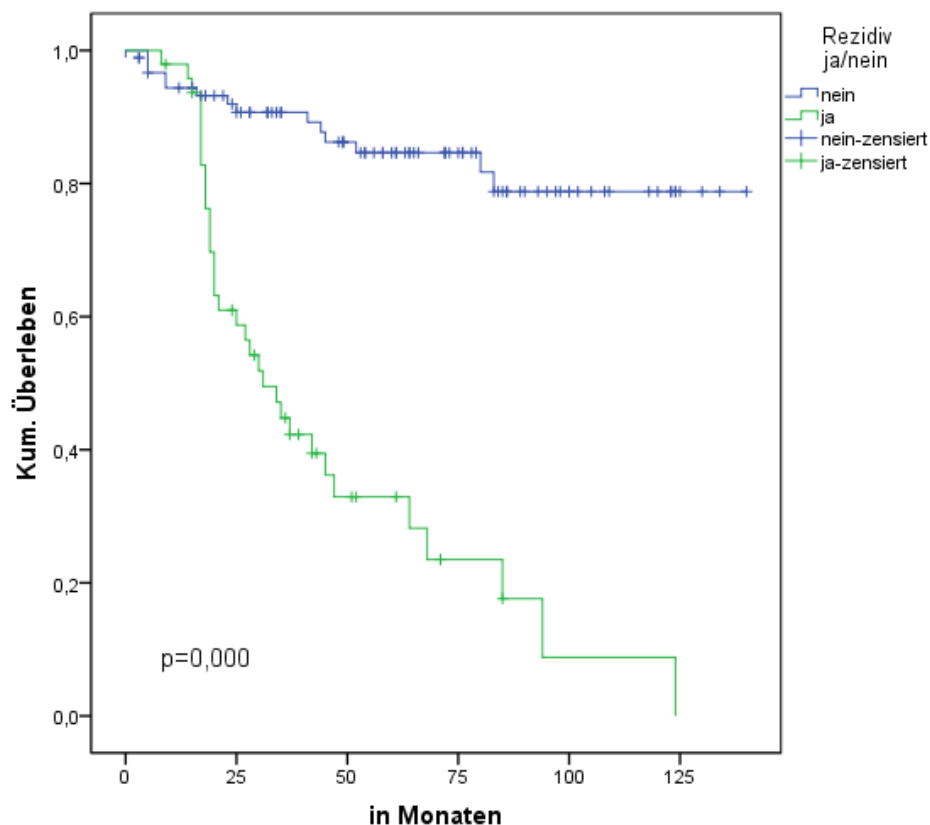


Abbildung 43: Overall Survival in Abhängigkeit vom Rezidivstatus

#### 4.1.9.4 Overall Survival und Behandlungsabschnitte

Bei jedem Patienten, der ein Rezidiv bzw. einen Progress der Erkrankung erlitten hatte oder auch ein Zweitmalignom aufgetreten war, wurde ein weiterer Behandlungsabschnitt angelegt. Jede Verschlechterung der Erkrankung wurde also in einem neuen Behandlungsabschnitt zum Ausdruck gebracht. Die Unterschiede zur Betrachtung des Overall Survival in Bezug auf Rezidive ergeben sich daher, dass hier auch Zweitmalignome betrachtet werden, welche bei den vorherigen Berechnungen nicht berücksichtigt wurden.

Patienten mit nur einem Behandlungsabschnitt lebten im Mittel 106,727 Monate. 82,2% von den 73 Patienten dieser Gruppe sind noch am Leben.

40 Patienten hatten im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv bzw. ein Zweitmalignom. Davon überlebten 55%. Das mittlere Überleben betrug 84,621 Monate in dieser Gruppe.

Zwei Rezidive wurden bei weiteren 20 Patienten verzeichnet, von denen 11 Patienten verstorben sind. Im Mittel überlebten diese Patienten 62,706 Monate.

Alle vier Patienten mit drei Rezidiven verstarben. Das mittlere Überleben betrug in dieser Gruppe 38,2 Monate. Ein Patient mit insgesamt vier Progressionen seiner Erkrankung verstarb nach 64,0 Monaten.

Dieser Zusammenhang ist statistisch signifikant mit  $p=0,000$ .

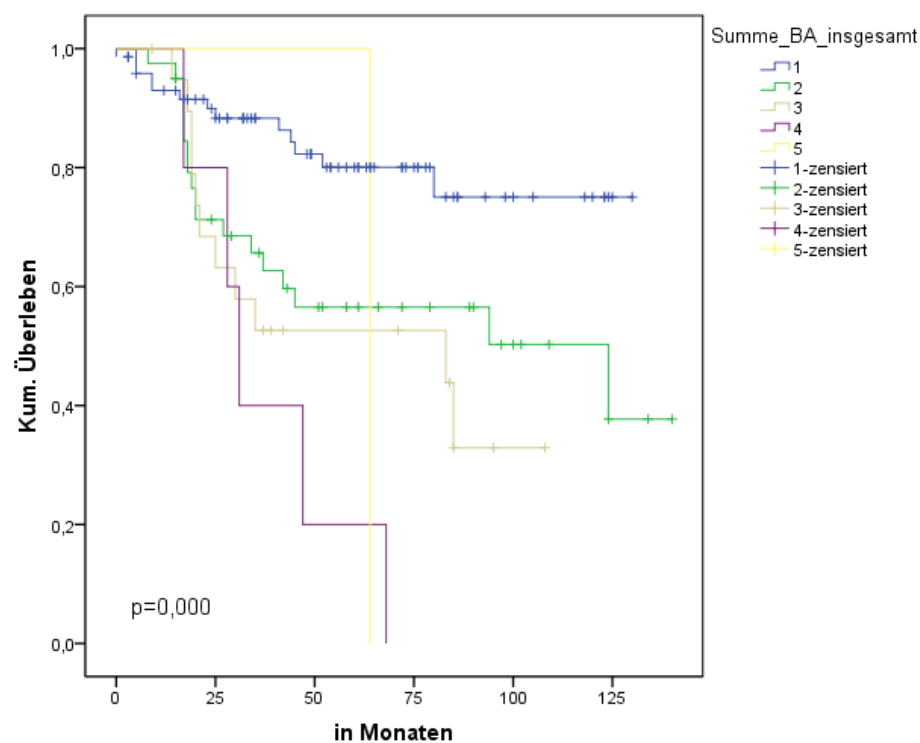


Abbildung 44: Overall Survival in Abhängigkeit von der Anzahl der Behandlungsabschnitte

#### 4.1.9.5 Overall Survival und Chemotherapie

Alle Fälle zusammengenommen, unterscheiden sich die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe nicht sehr voneinander ( $p=0,525$ ). Das mittlere Überleben bei Patienten mit Chemotherapie betrug 90,788 Monate und das der Patienten ohne Chemotherapie 89,103 Monate.

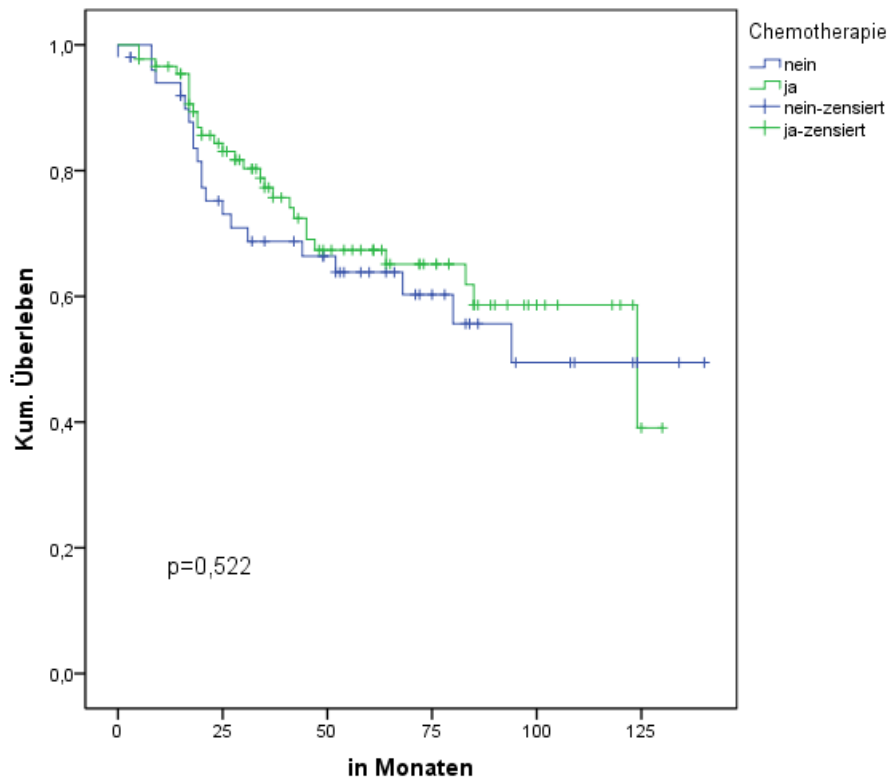


Abbildung 45: Overall Survival in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe

Unterteilt man jedoch die Patienten in die verschiedenen UICC-Stadien, ergeben sich Unterschiede. Keiner der Patienten im UICC-Stadium 1 und alle Patienten im UICC-Stadium 4 hatten eine Chemotherapie erhalten. Daher ist es in diesen Fällen nicht möglich, eine Auswertung zu erstellen. Im Stadium 2 gab es in beiden Gruppen jeweils nur einen gültigen Wert (je 1 Todesfall). Deshalb konnte auch hier keine Überlebensfunktion getrennt nach Chemotherapiegabe berechnet werden. Im UICC-Stadium 3 hingegen ergibt sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,011$ ) im Überleben der Patienten mit und ohne Chemotherapie. Von den 70

Patienten in diesem Stadium, die eine Chemotherapie erhalten hatten, überlebten 71,4%. Das mittlere Überleben betrug 95,561 Monate. 32 Patienten im Stadium 3 erhielten keine Chemotherapie. 19 dieser Patienten verstarben (59,4%). Sie überlebten im Mittel 69,492 Monate.

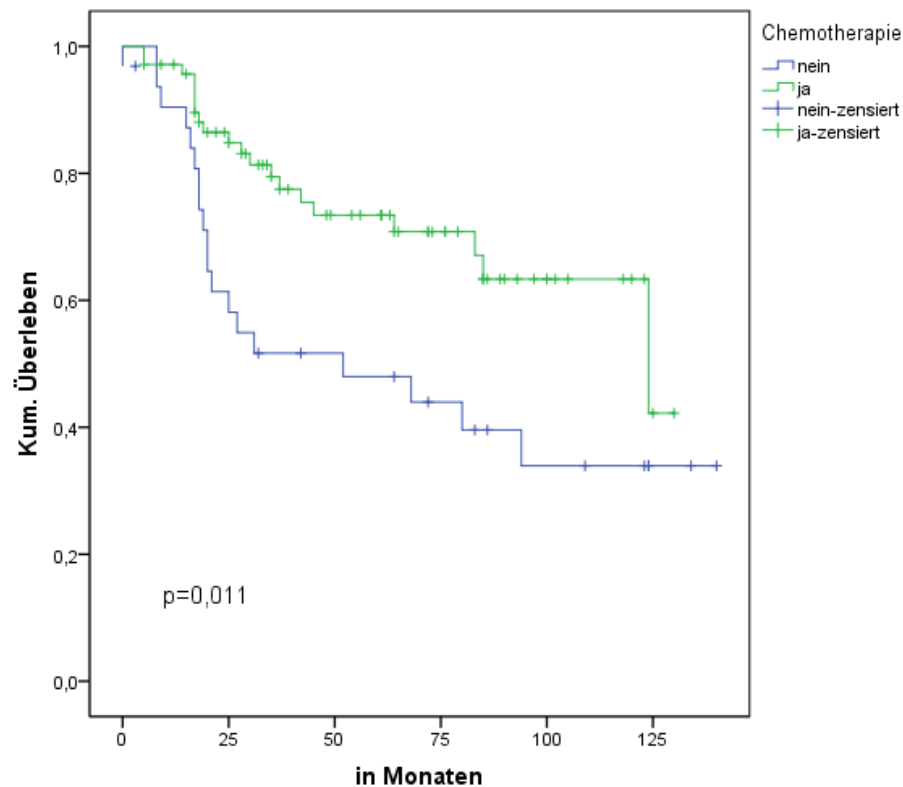


Abbildung 46: OS bei Patienten im UICC-Stadium 3 mit und ohne Chemotherapie

#### 4.1.9.6 Overall Survival und ASA-Score

Insgesamt gingen 136 Fälle zur Berechnung dieser Überlebenskurven ein. Patienten mit ASA1 zeigten mit 104,7 Monaten im Mittel ein etwas längeres Überleben als Patienten, die einen ASA-Score von 2 (83,264 Monate) hatten. Das kürzeste mittlere Überleben hatten jedoch Patienten mit einem ASA-Score von 3, nämlich 61,904 Monate. Diese unterschiedlichen Verläufe zeigen jedoch keine statistische Signifikanz ( $p=0,282$ ). Insgesamt überlebten im ASA1-Stadium 73,7%, im ASA2-Stadium 61,6% und im ASA3-Stadium 60% der Patienten.

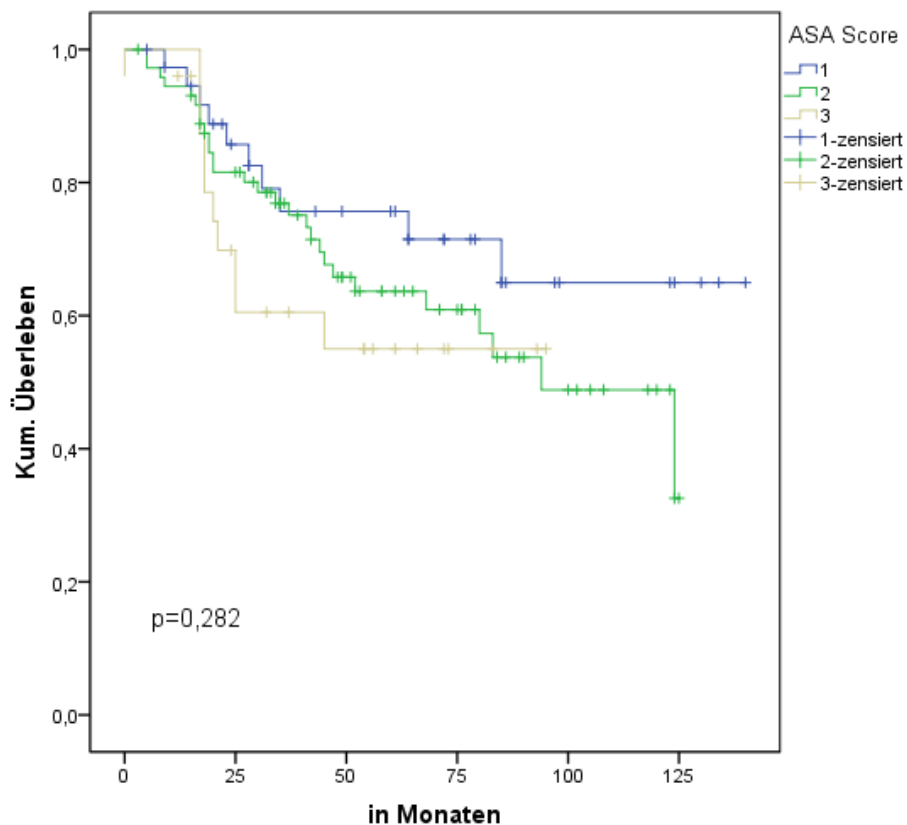


Abbildung 47: Overall Survival in Abhängigkeit vom ASA-Score

#### 4.1.9.7 Overall Survival und ECOG

Es werden insgesamt 59 Patienten bei der Betrachtung des Overall Survivals in Abhängigkeit der ECOG-Klassifikation berücksichtigt. Die körperliche Verfassung der Patienten – eingeteilt nach dem ECOG – führt zu einer signifikanten ( $p=0,003$ ) Veränderung des Überlebens. Patienten mit ECOG 0, also ohne körperliche Beschwerden, zeigten ein mittleres Überleben von 89,404 Monaten, während Patienten mit ECOG 1 nur 50,823 Monate im Mittel überlebten. Ein deutlicher Abfall im mittleren Überleben findet sich auch bei Patienten mit ECOG 2 (18 Monate) und ECOG 3 (17 Monate). Dabei überlebten 58,6% der 29 Patienten mit ECOG 0 und 22,2% der 27 Patienten mit ECOG 1. Weiterhin verstarb jeweils ein Patient mit ECOG 2 (50%) und ein Patient mit ECOG 3 (100%).

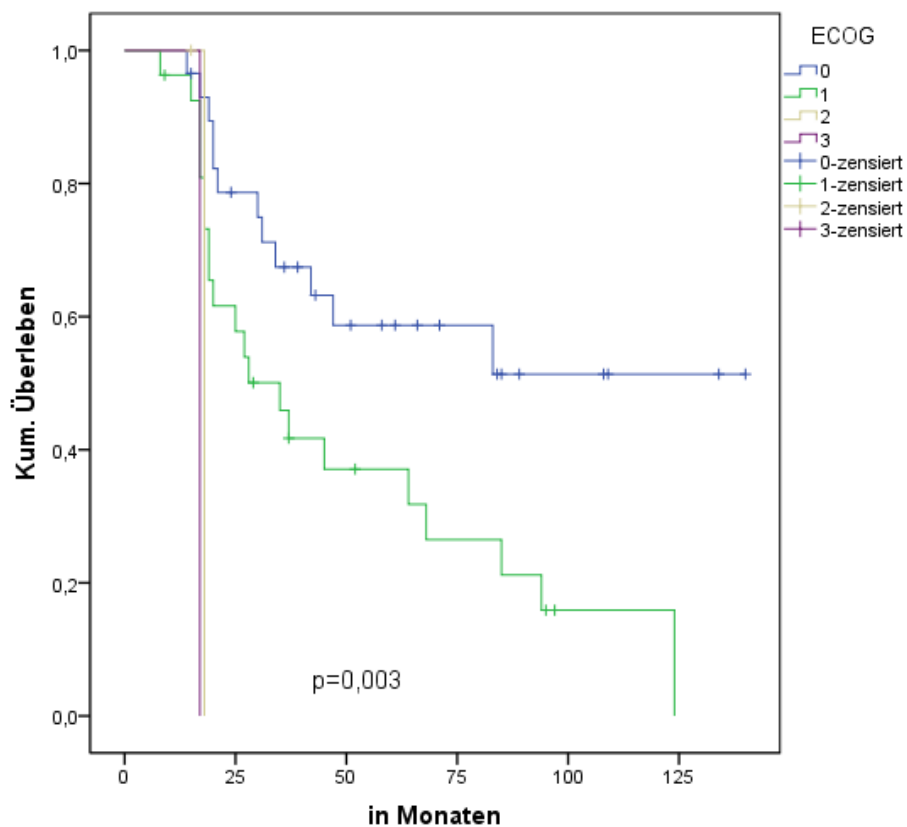


Abbildung 48: Overall Survival in Abhängigkeit von der ECOG-Klassifizierung



#### 4.1.9.8 Overall Survival und Therapieintention

Patienten, die mit einer kurativen Zielsetzung behandelt wurden, überlebten im Mittel 97,298 Monate und Patienten, bei denen eine palliative Therapiesituation vorlag, zeigten ein mittleres Überleben von 27,730 Monaten. Dieser Unterschied kann als statistisch signifikant betrachtet werden ( $p=0,000$ ). Von den 130 Patienten mit kurativer Therapieintention überlebten 68,5%, während von den 9 Patienten mit palliativer Zielsetzung nur 22,2% im Beobachtungszeitraum überlebten.

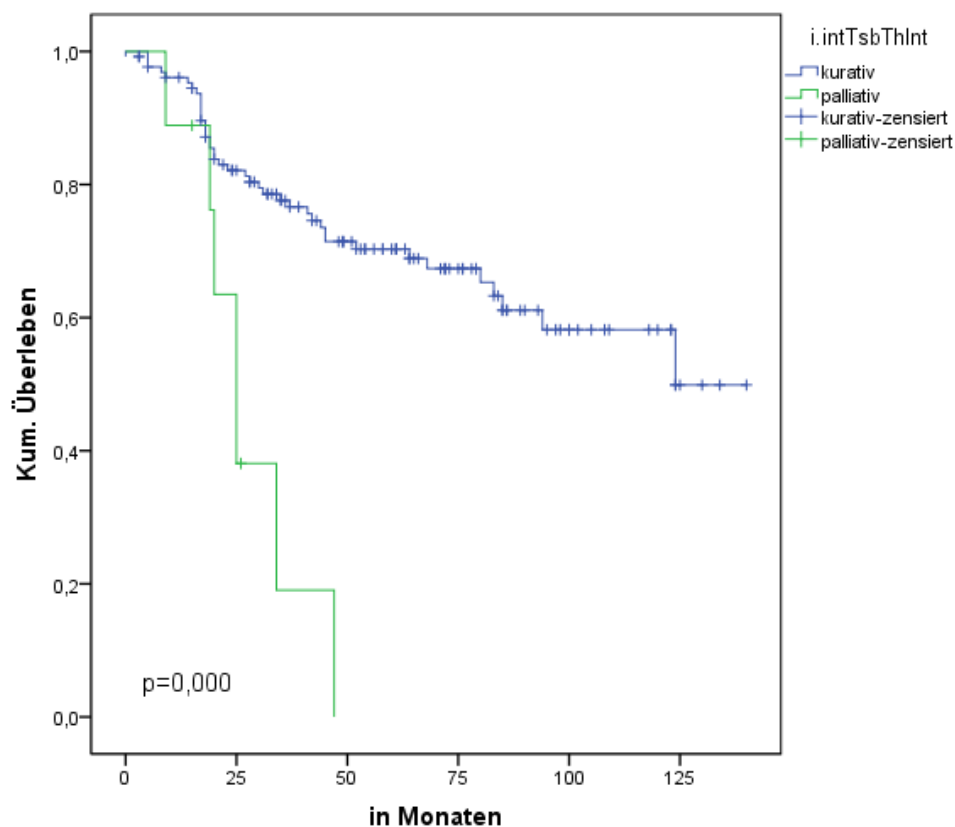


Abbildung 49: Overall Survival in Abhängigkeit von der Therapieintention

## 4.2 Methylierungsanalyse von CA4

Im Anhang sind die detaillierten Ergebnisse der Methylierungsanalyse der Promotorregion von CA4 von insgesamt 148 Fällen in Prozent zu finden. Der höchste Methylierungswert lag bei 73%. Das Minimum lag in 5 Fällen bei 0%. Der Median lag bei 11%. Um falsch positive Werte zu vermeiden, wurde ein Cut-off-Wert bei 10% Methylierung gesetzt. Dadurch ergaben sich 72 negativ und 76 positiv methylierte Fälle. Es haben also 48,6% einen negativen und 51,4% einen positiven Methylierungsstatus. In Abbildung 50 ist die Verteilung der prozentualen Methylierung graphisch dargestellt.

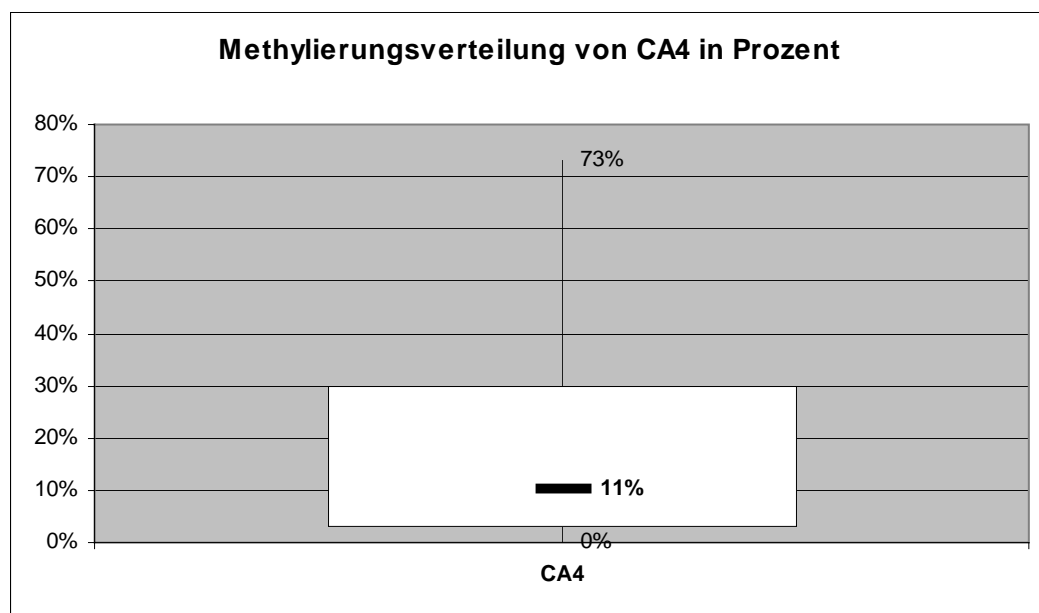


Abbildung 50: Verteilung der Methylierung von CA4 in Prozent als Boxplot

### 4.2.1 Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten

Insgesamt waren von den Fällen mit positivem Methylierungsstatus von CA4 zum Diagnosezeitpunkt 39,5% über bzw. genau 70 Jahre alt und 60,5% unter 70 Jahre. 33,3% der negativen Fälle hatten das 70. Lebensjahr überschritten, 66,7% waren jünger als 70 Jahre. Das bedeutet, dass 48,9% der unter 70-Jährigen positiv methyliert waren und 51,1% einen negativen Methylierungsstatus aufwiesen. Von den über 70-Jährigen waren 44,4% positiv und 55,6% negativ methyliert. Es ergab sich keine signifikante Korrelation.

Auch beim Staging ergab sich keine statistische Signifikanz. Von den Tumoren mit positivem Methylierungsstatus waren 1,3% pT1-, 10,5% pT2-, 59,2% pT3- und 28,9% pT4-klassifiziert. Bei den negativen Fällen lag in 1,4% ein pT1-, in 9,7% ein pT2-, in 61,1% ein pT3- und in 27,8% ein pT4-Stadium vor.

Beim Grading ergab sich eine signifikante Korrelation ( $p=0,023$ ). Bei den positiven Fällen waren 51,3% G2 und 48,7% G3 differenziert, während bei den negativen Fällen 69,4% G2 und nur 30,6% G3 differenziert waren.

Variable	Insgesamt (n=148)	CA4-Methylierung		
		positiv (n=76)	negativ (n=72)	
	n	n (%)	n (%)	p
<b>Alter (Diagnose)</b>				
<70	94	46 (48,9%)	48 (51,1%)	0,496
≥70	54	30 (55,6%)	24 (44,4%)	
<b>Tumorstadium</b>				
pT1	2	1 (50%)	1 (50%)	0,996
pT2	15	8 (53,3%)	7 (46,7%)	
pT3	89	45 (50,6%)	44 (49,4%)	
pT4	42	22 (52,4%)	20 (47,6%)	
<b>Grading</b>				
G2	89	39 (43,8%)	50 (56,2%)	0,023
G3	59	37 (62,7%)	22 (37,3%)	

**Tabelle 4-9: Alter, Tumorstadium und Grading in Korrelation zum Methylierungsstatus von CA4**

In Abbildung 51 ist die Verteilung von positivem und negativem Methylierungsstatus in den verschiedenen Differenzierungsstufen der Tumore als Kreisdiagramm dargestellt. Von den G2 differenzierten Tumoren sind knapp 44% positiv und 56% negativ methyliert. Bei den schlecht differenzierten Tumoren hingegen waren 63% positiv und nur 37% negativ methyliert.

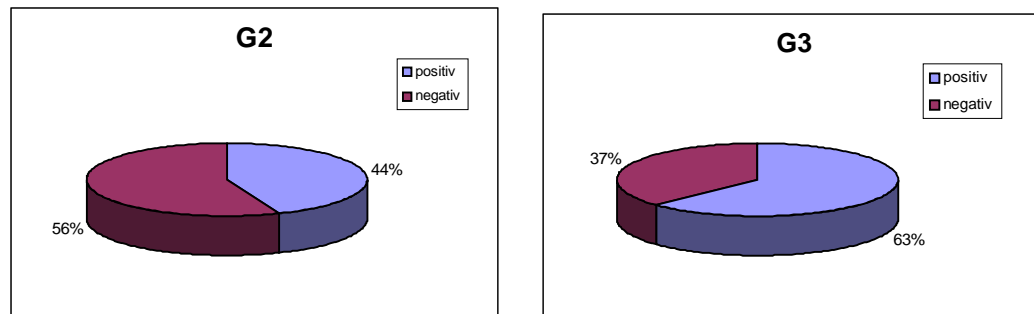


Abbildung 51: Korrelation von CA4-Methylierungsstatus und Grading

#### 4.2.2 Korrelation mit molekularen Charakteristika

Es ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen einem positiven Methylierungsstatus und einer hochgradigen Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) mit  $p=0,016$ . Während bei den Fällen mit MSS bzw. MSI-L ein beinahe ausgewogenes Verhältnis zwischen methylierten (48,5%) und unmethylierten (51,5%) Fällen besteht, sind bei den MSI-H-Fällen mit 81,3% deutlich mehr Fälle methyliert als unmethyliert.

Kein signifikanter Unterschied ergab sich hingegen für CIN ( $p=0,097$ ), KRAS- ( $p=0,252$ ) und BRAF-Mutation ( $p=0,286$ ).

Chromosomale Instabilität (CIN) wurde ab einer somatischen Deletion (loss of heterozygosity, LOH) von über 33% definiert. Die chromosomale Instabilität war mittels FISH ermittelt worden und diese Ergebnisse lagen dieser Arbeit vor. Insgesamt wurden für diese Berechnung 147 Fälle berücksichtigt. Es hatte sich ein relativ ausgeglichenes Verhältnis zwischen methylierten und unmethylierten Fällen in Bezug auf den CIN-Status gezeigt.

Obwohl sich bei Fällen mit KRAS-Mutation im Exon 13 69,2% der Fälle methyliert zeigten (Mutation im Exon 12 nur 58,3%), konnte auch hier keine Signifikanz nachgewiesen werden. Fasst man beide Mutationen zusammen, zeigen sich 61,2% der Fälle mit KRAS-Mutation mit positivem

Methylierungsstatus. 38,8% waren nicht methyliert. In diese Berechnung gingen 145 Fälle ein.

Von den insgesamt 128 Fällen, bei denen auch eine BRAF-Mutations-Analyse durchgeführt worden war, lag in 120 Fällen der Wildtyp vor. Im Wildtyp zeigte sich eine nahezu ausgeglichene Verteilung von methylierten und unmethylierten Fällen. In den 8 Fällen mit Mutation in BRAF war ein deutlicher Trend ersichtlich: 6 Fälle waren methyliert, während nur 2 Fällen nicht methyliert waren. Statistische Signifikanz konnte bei geringer Fallzahl nicht ermittelt werden.

Variable	Insgesamt	CA4-Methylierung		
		positiv	negativ	
	n	n (%)	n (%)	p
<b>MSI-Status</b>				
MSS/MSI-L	130	63 (48,5%)	67 (51,5%)	<b>0,016</b>
MSI-H	16	13 (81,3%)	3 (18,7%)	
Gesamt	146	76 (52%)	70 (48%)	
<b>CIN</b>				
Kein CIN	87	50 (57,5%)	37 (42,5%)	0,097
CIN (>33% LOH)	60	26 (43,3%)	34 (56,7%)	
Gesamt	147	76 (51,7%)	71 (48,3%)	
<b>KRAS</b>				
Wildtyp	96	46 (47,9%)	50 (52,1%)	0,252
Exon 12 mutiert	36	21 (58,3%)	15 (41,7%)	
Exon 13 mutiert	13	9 (69,2%)	4 (30,8%)	
Gesamt	145	76 (52,4%)	69 (47,6%)	
<b>BRAF</b>				
Wildtyp	120	63 (52,5%)	57 (47,5%)	0,286
Mutiert	8	6 (75%)	2 (25%)	
Gesamt	128	69 (53,9%)	59 (46,1%)	

**Tabelle 4-10: MSI-Status, CIN, KRAS- und BRAF-Mutation in Korrelation zum Methylierungsstatus von CA4**

### 4.2.3 Korrelation mit p53-Status

Insgesamt lagen in 143 Fällen Daten zum p53-Status vor. Diese waren anhand immunhistochemischer Untersuchung ermittelt worden. In den Fällen mit p53-Nachweis zeigten sich mit 42,7% (positiv) zu 57,3% (negativ) beinahe ausgewogene Verhältnisse. Bei Abwesenheit von p53 sind mit 68,5% deutlich mehr Promotoren methyliert als unmethyliert (31,5%). Es zeigen sich also mehr als doppelt so viele Fälle mit positivem Methylierungsstatus als unmethylierte Fälle, wenn p53 nicht vorhanden ist. Diese Korrelation ist statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0,003.

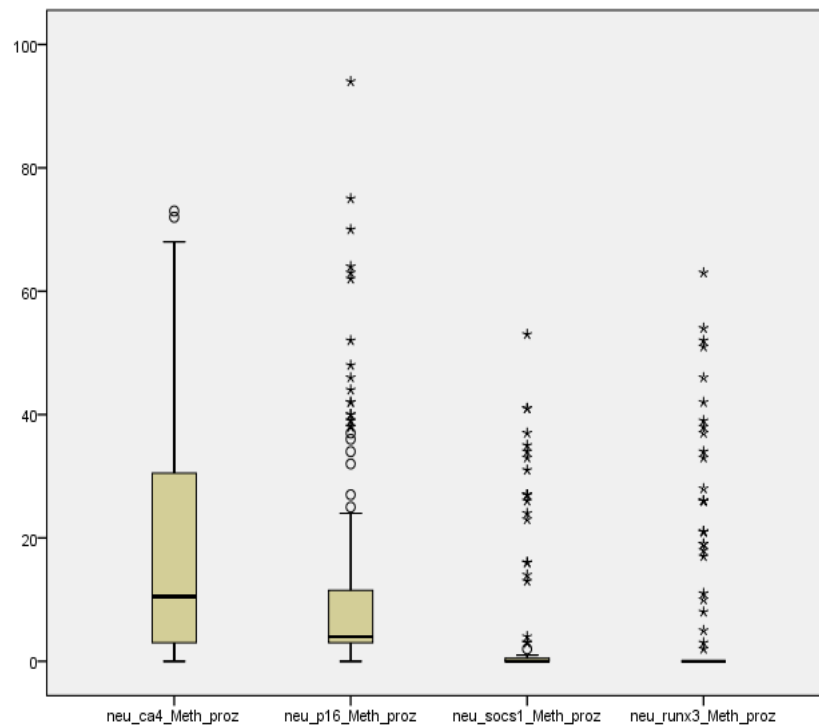
Variable	Insgesamt	CA4-Methylierung		
		positiv	negativ	
	n	n (%)	n (%)	p
<b>p53</b>				
p53 (>5%)	89	38 (42,7)%	51 (57,3)%	<b>0,003</b>
kein p53	54	37 (68,5)%	17 (31,5)%	
Gesamt	143	75 (52,4)%	68 (47,6)%	

Tabelle 4-11: p53-Verlust in Korrelation zum Methylierungsstatus von CA4

## 4.3 Methylierungsanalyse der CIMP-Marker

Im Anhang sind die Einzelergebnisse der Methylierungsanalyse der CIMP-Marker p16, SOCS1 und RUNX3 in Prozent zusammengestellt. In Abbildung 52 sind die Verteilungen der Promotormethylierungen von CA4, p16, SOCS1 und RUNX3 in Prozent anhand eines Boxplots dargestellt.

Der maximal erreichte Wert an Methylierung lag bei CA4 bei 73%, bei p16 bei 94%, bei SOCS1 bei 53% und bei RUNX3 bei 63%. Das Minimum lag bei allen Markern bei 0%. Der Median lag bei CA4 bei 10,5%, bei p16 bei 4%. Bei SOCS1 und RUNX3 lag der Median jeweils bei 0. Im Mittel lag die Methylierung bei CA4 bei 18,3%, bei p16 bei 12%, bei SOCS1 bei 3,7% und bei RUNX3 bei 5,4%.



**Abbildung 52: Verteilung von CA4- und CIMP-Marker-Methylierung in Prozent**

Neurog1 und IGF2 sind zwei weitere CIMP-Marker, deren Daten bereits vorlagen. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse dieser zwei CIMP-Marker werden in den folgenden Berechnungen verwendet.

Der Methylierungsstatus der CIMP-Marker SOCS1, RUNX3, IGF2 und Neurog1 wurde als positiv gewertet, wenn ihr Wert größer oder gleich 5% war. Bei p16 wurde ein Cut-off von 10% eingesetzt. Der Cut-off wurde gesetzt, um falsch positive Werte zu vermeiden. Bei RUNX3 und SOCS1 (auch bei IGF2 und Neurog1) lagen recht eindeutige prozentuale Werte vor, so dass der Cut-off mit 5% sehr niedrig angesetzt werden konnte. Bei p16 lag der Anteil der Methylierung in 71 Fällen um die 5% (3-7%). Um keine falsch-positiven Fälle zu produzieren, wurde der Cut-off mit 10% höher angesetzt.

Der Promotor von p16 war somit in 26,4% (39 Fälle) der Tumore methyliert, RUNX3 zeigte in 18,2% (27 Fälle) und SOCS1 in 12,2% (18 Fälle) einen positiven Methylierungsstatus. Der Median lag bei den positiven Fällen von CA4 bei 29,5%, von p16 bei 36%, von SOCS1 bei 27% und von RUNX3 bei 26%.

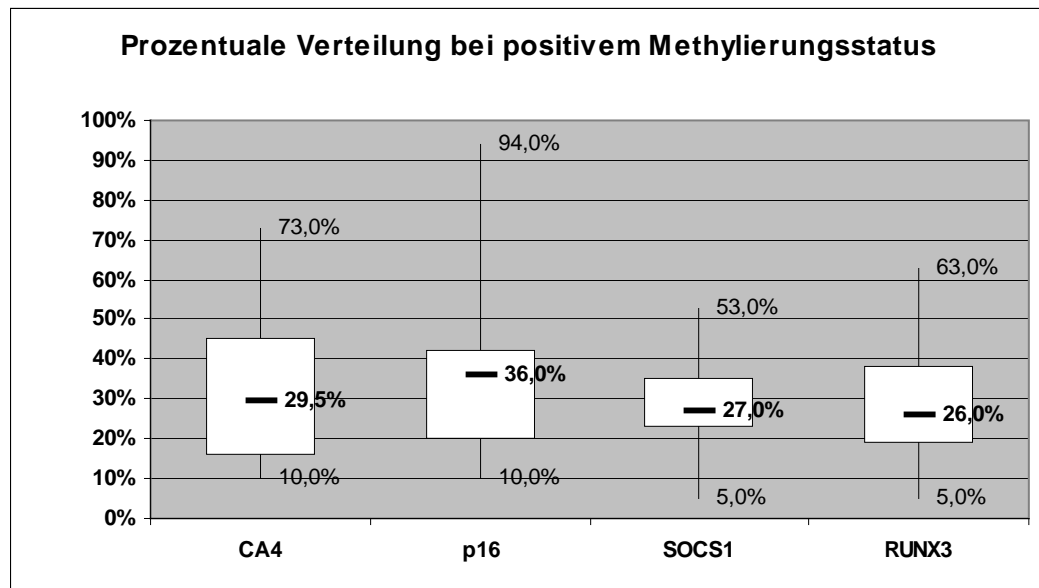


Abbildung 53: Prozentuale Verteilung bei positivem Methylierungsstatus als Boxplot

Für IGF2 konnte nur in 147 Fällen der Methylierungsstatus erhoben werden. Der Fall, für den kein Methylierungswert für IGF2 vorliegt, wurde in den Berechnungen, die diesen Marker beinhalten, nicht berücksichtigt.

Von insgesamt 147 Fällen war in 71 Fällen (48,3%) kein CIMP-Marker positiv, während in 11 Fällen (7,5%) alle fünf CIMP-Marker positiv waren. In Abbildung 54 ist die Häufigkeitsverteilung der synchron methylierten CIMP-Marker graphisch dargestellt.

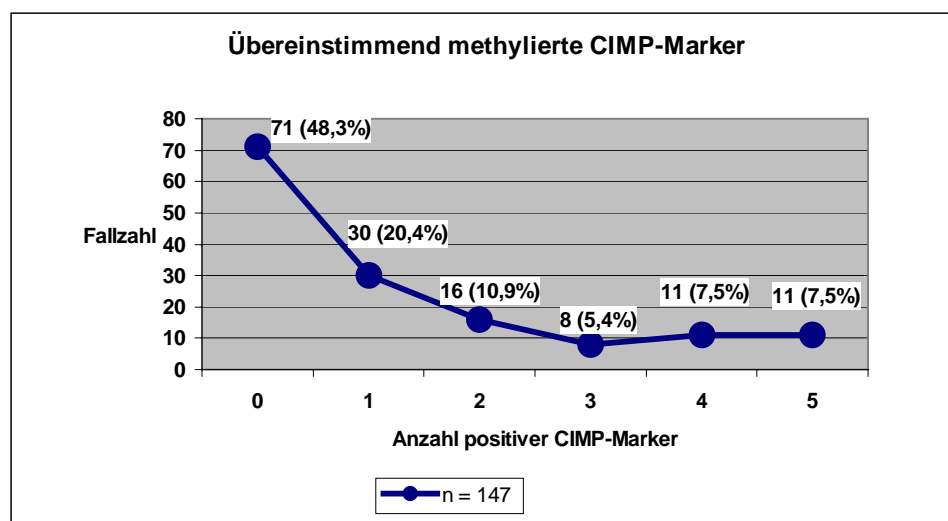


Abbildung 54: Häufigkeitsverteilung der Methylierung der CIMP-Marker



#### 4.4 Korrelation von CA4- und CIMP-Methylierung

Die Methylierung aller fünf analysierten CIMP-Marker korreliert signifikant mit der Methylierung von CA4. Der p-Wert der Korrelation von p16 mit CA4 beträgt 0,001, der p-Wert der restlichen CIMP-Marker <0,001. p16 und Neurog1 sind in etwas über 70% der Fälle zusammen mit CA4 methyliert, während bei RUNX3, SOCS1 und bei IGF2 in über 90% der Fälle eine gemeinsame Methylierung mit CA4 vorliegt.

Variable	Insgesamt	CA4-Methylierung		
		positiv	negativ	
	n	n (%)	n (%)	p
<b>p16</b>				
negativ	109	47 (43,1%)	62 (56,9%)	0,001
positiv	39	<b>29 (74,4%)</b>	10 (25,6%)	
Gesamt	148	76 (51,4%)	72 (48,6%)	
<b>RUNX3</b>				
negativ	121	51 (42,1%)	70 (57,9%)	0
positiv	27	<b>25 (92,6%)</b>	2 (7,4%)	
Gesamt	148	76 (51,4%)	72 (48,6%)	
<b>SOCS1</b>				
negativ	130	59 (45,4%)	71 (54,6%)	0
positiv	18	<b>17 (94,4%)</b>	1 (5,6%)	
Gesamt	148	76 (51,4%)	72 (48,6%)	
<b>IGF2</b>				
negativ	112	44 (39,3%)	68 (60,7%)	0
positiv	35	<b>32 (91,4%)</b>	3 (8,6%)	
Gesamt	147	76 (51,7%)	71 (48,3%)	
<b>Neurog1</b>				
negativ	81	27 (33,3%)	54 (66,7%)	0
positiv	67	<b>49 (73,1%)</b>	18 (26,9%)	
Gesamt	148	76 (51,4%)	72 (48,6%)	

Tabelle 4-12: Korrelation Methylierungsstatus CIMP-Marker und CA4

In Tabelle 4-13 ist das Verhältnis der übereinstimmenden Methylierung der CIMP-Marker und CA4 am Gesamtkollektiv dargestellt. 11,5% des Kollektivs sind gleichzeitig im Promotor von CA4 und SOCS1 methyliert und 19,6% der Fälle im Promotor von CA4 und p16. Bei RUNX3 und CA4 sind es 16,9%, während 21,8% zugleich in IGF2 und CA4 methyliert sind. Die Promotormethylierung von Neurog1 hat mit 33,1% den größten Anteil am Gesamtkollektiv, welcher auch gleichzeitig mit dem von CA4 methyliert ist.

	SOCS1 und CA4		RUNX3 und CA4		IGF2 und CA4		Neurog1 und CA4		p16 und CA4	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
keiner methyliert	71	48,0	70	47,3	68	46,3	54	36,5	62	41,9
einer methyliert	60	40,5	53	35,8	47	32,0	45	30,4	57	38,5
beide methyliert	17	11,5	25	16,9	32	21,8	49	33,1	29	19,6
<b>Gesamt</b>	148	100	148	100	147	100	148	100	148	100

Tabelle 4-13: Methylierung von CA4 und CIMP-Markern

In Abbildung 55 ist die Verteilung der synchronen Methylierung von CA4 und den CIMP-Markern graphisch dargestellt. Hier kann man deutlich sehen, dass Neurog1 am häufigsten gleichzeitig mit dem Promotor von CA4 methyliert ist.

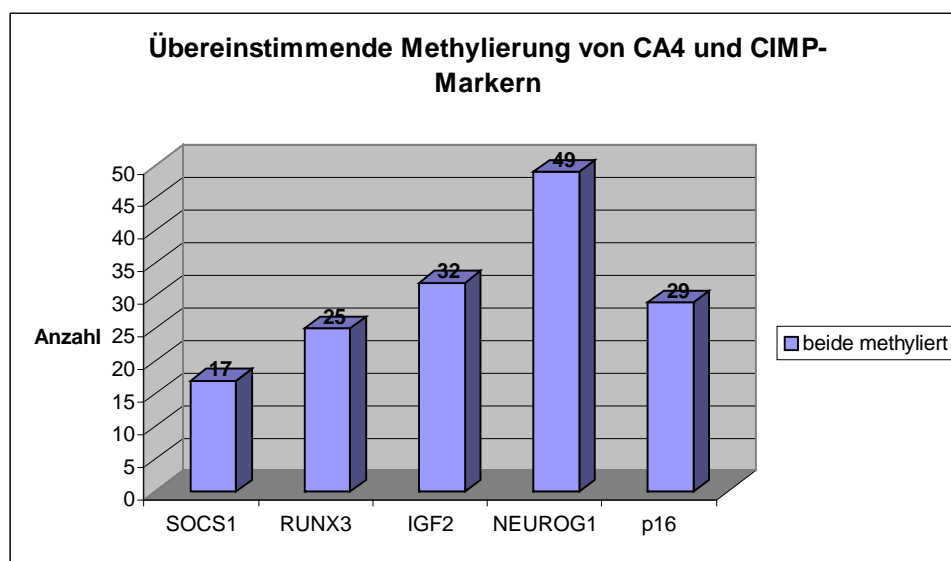


Abbildung 55: Gleichzeitige Methylierung von CA4 und CIMP-Markern

In Tabelle 4-14 ist dargestellt, wie sich die CA4-Methylierung in Bezug zur CIMP-Marker-Methylierung verhält. 32,9% der Fälle, welche in der Promotorregion von CA4 eine Methylierung aufwiesen, zeigten keine Methylierung der CIMP-Marker. Ab 3 positiven CIMP-Markern war CA4 immer methyliert. Alle sechs Marker waren in 11 Fällen (7,5%) gleichzeitig positiv, während in 31,3% weder einer der CIMP-Marker noch CA4 methyliert war. In 20,4% der Fälle liegt ein positiver CIMP-Status vor ( $\geq 3$  CIMP-Marker positiv). Wenn man CA4 als CIMP-Marker wertet, erhöht sich die Zahl der CIMP-positiven Tumore auf 25,9% (38 Fälle).

Variable	CA4-Methylierung			
	negativ		positiv	
	n	%	n	%
<b>0 CIMP-Marker positiv</b>	46	64,8%	<b>25</b>	<b>32,9%</b>
<b>1 CIMP-Marker positiv</b>	17	23,9%	13	17,1%
<b>2 CIMP-Marker positiv</b>	8	11,3%	8	10,5%
<b>3 CIMP-Marker positiv</b>	0	0%	8	10,5%
<b>4 CIMP-Marker positiv</b>	0	0%	11	14,5%
<b>5 CIMP-Marker positiv</b>	0	0%	11	14,5%
<b>Gesamt</b>	71	100%	76	100%

Tabelle 4-14: Kreuztabelle zur CA4- und CIMP-Marker-Methylierung

In Abbildung 56 ist eine graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der zugleich methylierten Marker inklusive CA4 zu sehen.

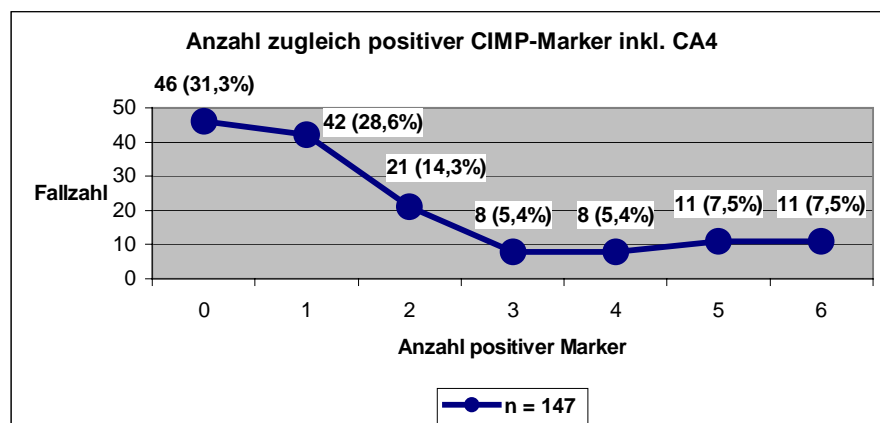


Abbildung 56: Synchrone Methylierung aller CIMP-Marker und CA4

## 4.5 Überlebenskurven

### 4.5.1 Progressionsfreies Überleben

Das progressionsfreie Überleben wurde analog zu dem des Ausgangskollektives bestimmt. Es wurde jede Verschlechterung der Erkrankung oder der Tod des Patienten als Endpunkt festgelegt. Zweitmalignome wurden nicht als Progression der Erkrankung gewertet.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied im progressionsfreien Überleben von Fällen mit positivem und negativem Methylierungsstatus ( $p=0,894$ ). Im Mittel überlebten Patienten mit positiver Methylierung von CA4 82,54 Monate und mit negativer 77,11 Monate progressionsfrei.

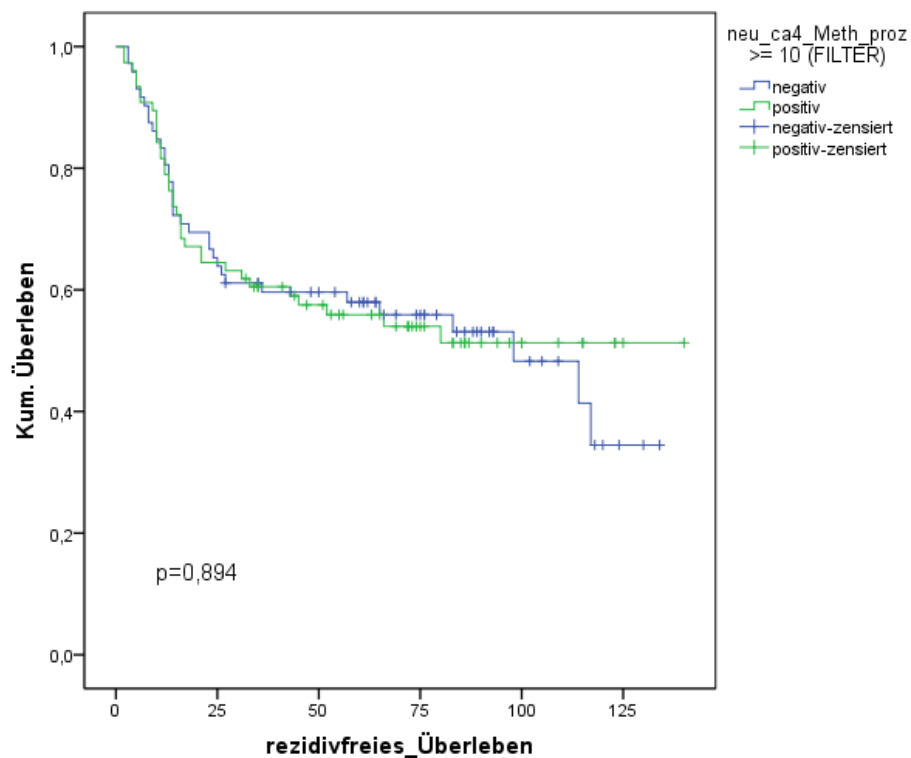


Abbildung 57: Progressionsfreies Überleben bei Patienten mit positivem und negativem Methylierungsstatus

Führt man jedoch eine weitere Unterteilung der positiv- und negativmethylierten Fälle in Hinsicht auf Chemotherapiegabe durch, ergeben sich Unterschiede im Verlauf.

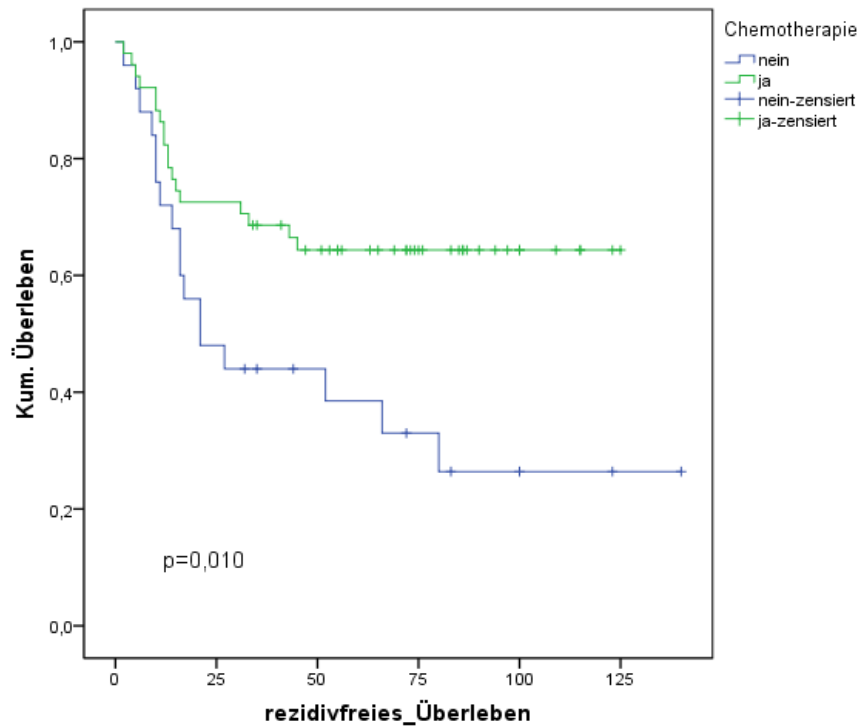
Patienten mit positivem Methylierungsstatus überlebten im Mittel 56,13 Monate progressionsfrei, wenn sie nicht chemotherapeutisch behandelt wurden, während die Patienten, die eine Chemotherapie erhalten hatten, 86,37 Monate im Mittel ohne Rezidiv überlebten. Dieser Unterschied im progressionsfreien Überleben der beiden Subgruppen ist mit  $p=0,01$  statistisch signifikant.

Bei den methylierungsnegativen Fällen hingegen, hat sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,191$ ) im mittleren progressionsfreien Überleben bei Patienten mit und ohne Chemotherapie ergeben. Die Patienten mit Chemotherapie überlebten 69,93 Monate rezidivfrei und die Patienten, die keine Chemotherapie erhalten hatten, 92,7 Monate.

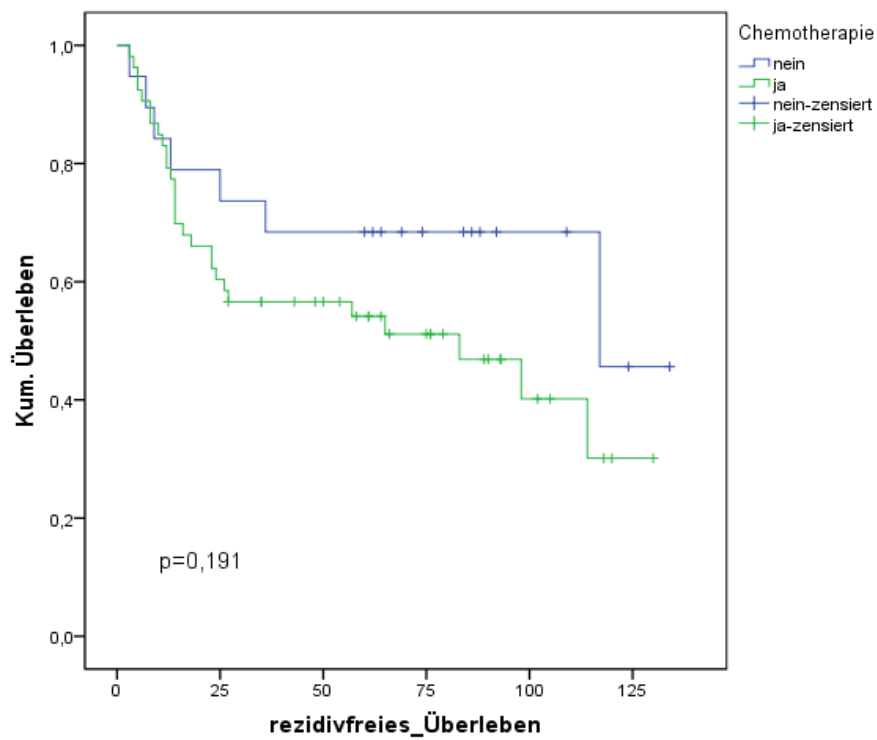
Methylierung von CA4					
positiv			negativ		
keine Chemo	Chemo	p	keine Chemo	Chemo	p
56,13 (n = 25)	86,37 (n = 51)	<b>0,01</b>	92,70 (n = 19)	69,93 (n = 53)	0,191

**Tabelle 4-15: Progressionsfreies Überleben in Monaten in Abhängigkeit von Methylierungsstatus und Gabe von Chemotherapie**

In Abbildung 58 ist das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit positivem und in Abbildung 59 mit negativem Methylierungsstatus von CA4 in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.



**Abbildung 58: Progressionsfreies Überleben bei positivem Methylierungsstatus von CA4 in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe**



**Abbildung 59: Progressionsfreies Überleben bei negativem Methylierungsstatus von CA4 in Abhängigkeit von der Gabe von Chemotherapie**

### 4.5.2 Overall Survival

Das Gesamtüberleben wurde analog zu dem des Ausgangskollektives bestimmt. Der Tod des Patienten wurde als Endpunkt gesetzt. Zur Berechnung des Follow-up der lebenden Patienten wurde das letzbekannte Datum herangezogen, an dem der Patient zur Untersuchung oder Therapie vorstellig wurde.

#### 4.5.2.1 Overall Survival CA4

Im Gesamtüberleben ergibt sich kein signifikanter Unterschied bei Patienten mit positivem und negativem Methylierungsstatus ( $p=0,693$ ). Die Patienten, deren Tumore eine positive Methylierung zeigten, überlebten im Mittel 87,96 Monate und die mit negativem Status 87,54 Monate.

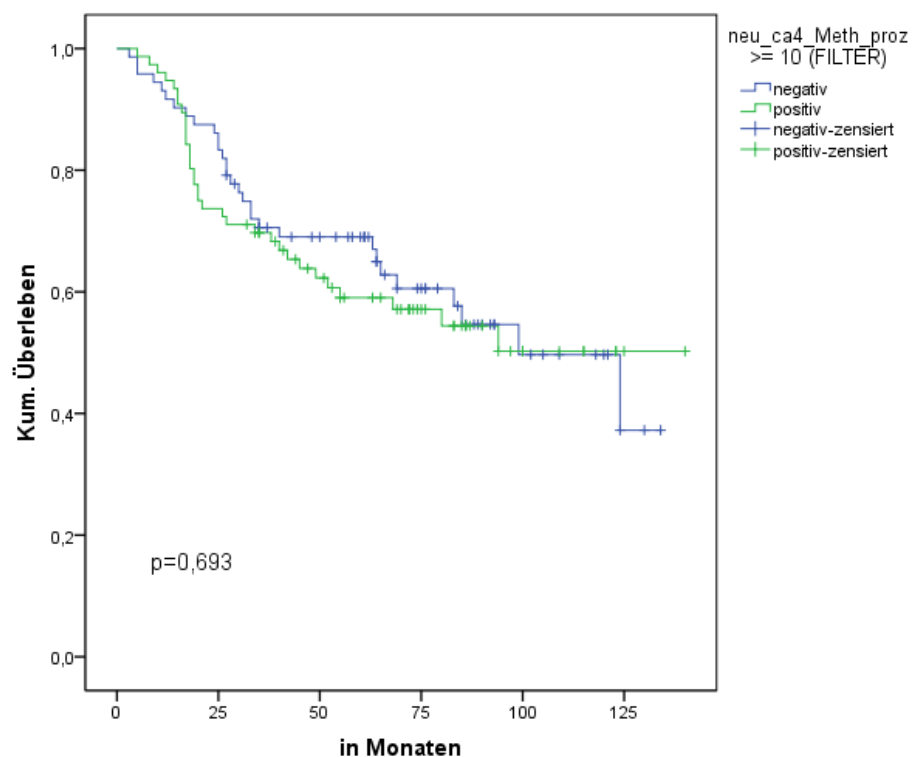


Abbildung 60: Gesamtüberleben von Patienten mit positivem und negativem Methylierungsstatus

Wie beim rezidivfreien Überleben zeigt sich auch beim Gesamtüberleben ein signifikanter Unterschied bei den Patienten mit Methylierung in der Promotorregion von CA4, die Chemotherapie erhalten hatten, und den positiven Fällen ohne chemotherapeutische Behandlung ( $p=0,002$ ).

Die positiven Fälle ohne Chemotherapie überlebten im Mittel nur 60,64 Monate, während die Patienten mit Chemotherapie 93,31 Monate mittleres Überleben aufwiesen. Die Patienten mit positivem Methylierungsstatus und chemotherapeutischer Behandlung lebten also im Mittel 32,67 Monate länger, als die Patienten ohne Chemotherapie.

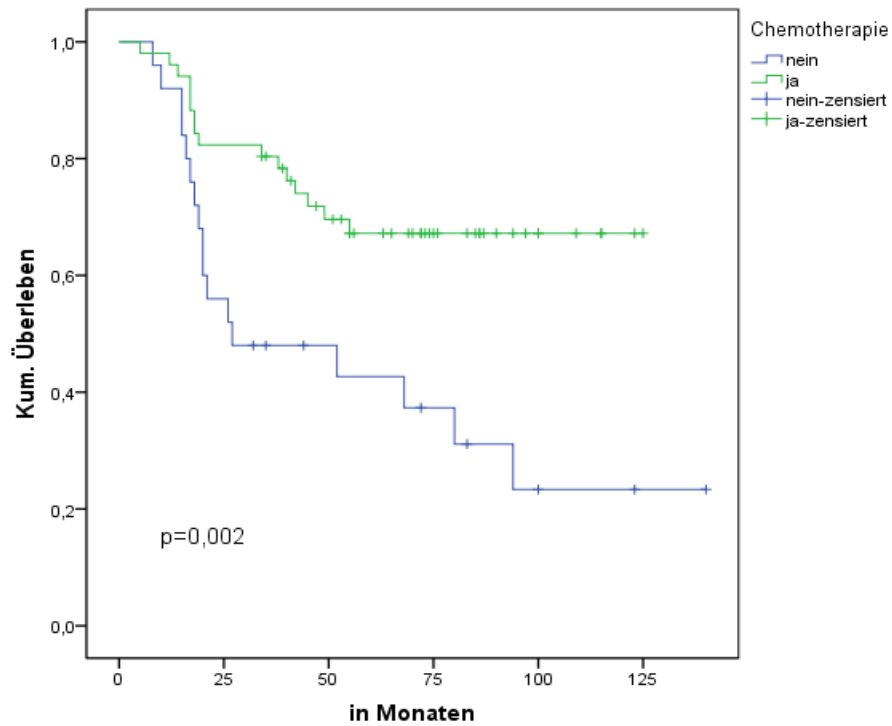
Bei den in CA4 methylierungsnegativen Fällen hingegen ergab sich kein signifikanter Unterschied im Überleben der Patienten mit und ohne Chemotherapie ( $p=0,229$ ). In Fällen mit negativem Methylierungsstatus überlebten die Patienten im Mittel 99,38 Monate, wenn sie keine Chemotherapie erhalten hatten, und 81,2 Monate, wenn sie chemotherapeutisch behandelt wurden.

Marker	Methylierung					
	positiv			negativ		
	keine Chemo	Chemo	p	keine Chemo	Chemo	p
CA4						
	60,64 (n = 25)	93,31 (n = 51)	<b>0,002</b>	99,38 (n = 19)	81,2 (n = 53)	0,229

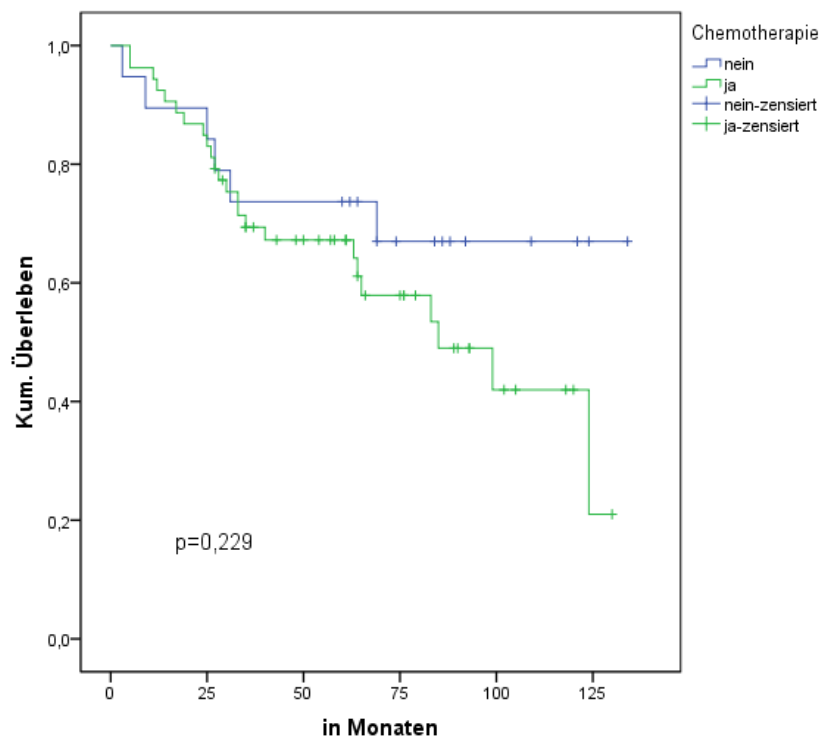
**Tabelle 4-16: Mittleres Gesamtüberleben in Monaten in Abhängigkeit von CA4-Methylierungsstatus und Gabe von Chemotherapie**

In Abbildung 61 ist das Gesamtüberleben bei methylierungspositiven Fällen und in Abbildung 62 bei negativen Fällen in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.





**Abbildung 61: Überlebenskurve bei positivem Methylierungsstatus von CA4 in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe**



**Abbildung 62: Überlebenskurve bei negativem Methylierungsstatus von CA4 in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe**

#### 4.5.2.2 Overall Survival CIMP-Marker

Eine signifikante Unterscheidung der Überlebenskurven zeigte sich weder bei den methylierungspositiven noch bei den –negativen Fällen von p16, SOCS1, RUNX3, IGF2 und Neurog1, wenn man sie in Gruppen mit und ohne Chemotherapie unterteilt. Ebenso verhielt es sich mit den CIMP-Fällen. Der CIMP-Status hatte keinen Einfluss auf das mittlere Überleben. Ein positiver CIMP-Status wurde ab drei positiven Fällen definiert (145). Patienten mit Tumoren mit positivem CIMP-Status überlebten im Mittel 78,74 Monate, während Patienten mit CIMP-negativen Tumoren ein mittleres Überleben von 89,3 Monaten zeigten ( $p=0,678$ ).

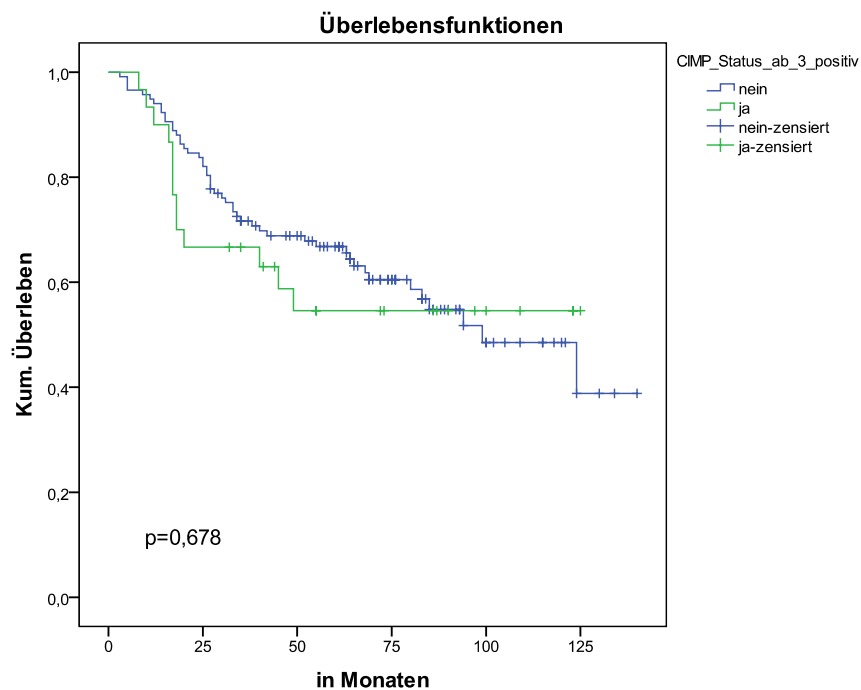
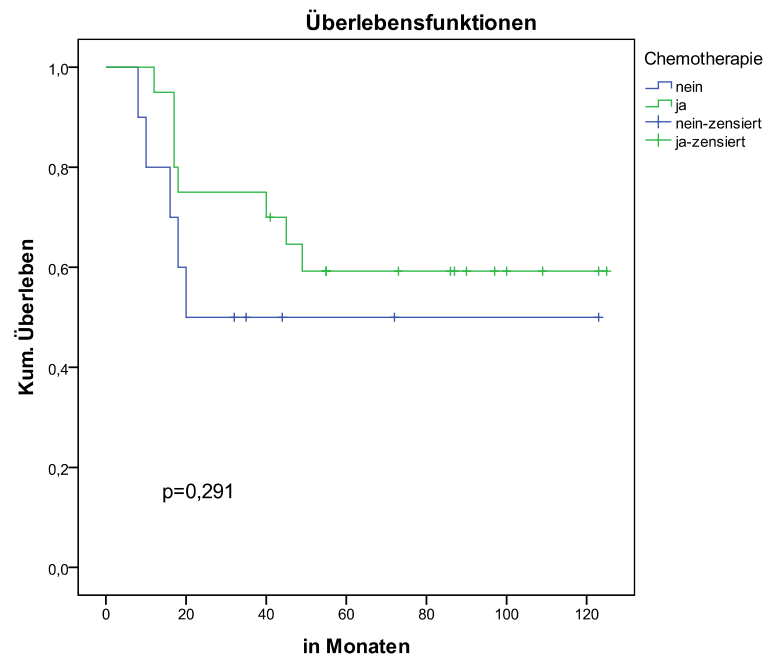
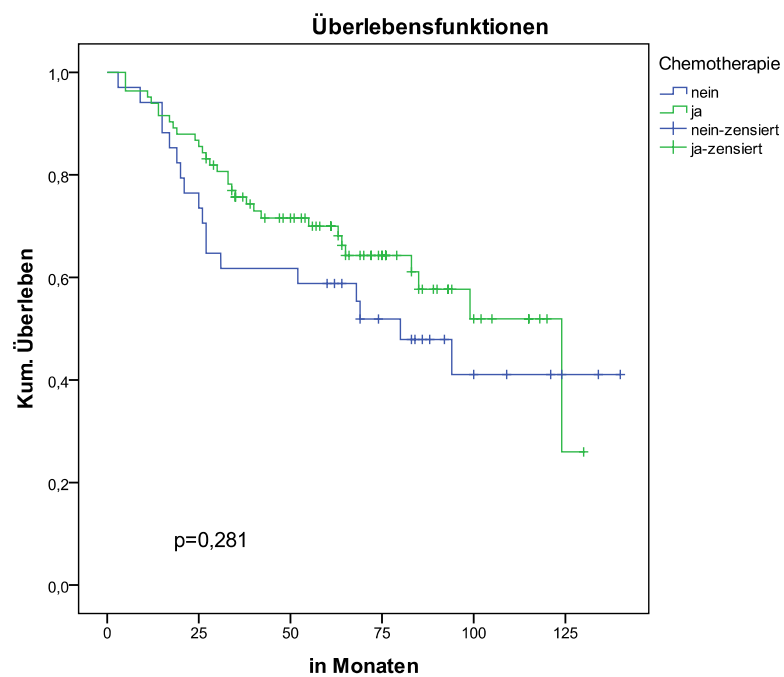


Abbildung 63: Gesamtüberleben der CIMP-positiven und –negativen Fälle



**Abbildung 64: Gesamtüberleben der CIMP-positiven Fälle in Abhängigkeit von Chemotherapie**



**Abbildung 65: Gesamtüberleben der CIMP-negativen Fälle in Abhängigkeit von Chemotherapie**

Die genauen mittleren Überlebenszeiten und p-Werte für die jeweiligen Gruppen sind der Tabelle 4-17 zu entnehmen.

Marker	Methylierung					
	positiv			negativ		
	keine Chemo	Chemo	p	keine Chemo	Chemo	p
<b>p16</b>						
	52,58 (n = 15)	82,83 (n = 24)	0,300	83,08 (n = 29)	88,46 (n = 80)	0,420
<b>SOCS1</b>						
	80,8 (n = 5)	102,03 (n = 13)	0,398	77,56 (n = 39)	85,01 (n = 91)	0,254
<b>RUNX3</b>						
	59,1 (n = 10)	89,22 (n = 17)	0,109	83,59 (n = 34)	86,69 (n = 87)	0,522
<b>IGF2</b>						
	67 (n = 11)	87,45 (n = 24)	0,209	80,63 (n = 33)	87,51 (n = 79)	0,315
<b>Neurog1</b>						
	61,92 (n = 25)	87,92 (n = 42)	0,053	92,78 (n = 19)	86,17 (n = 62)	0,859
<b>CIMP</b>						
	68,7 (n = 10)	85,15 (n = 20)	0,291	80,890 (n = 34)	88,440 (n = 83)	0,281

**Tabelle 4-17: Mittleres Gesamtüberleben in Monaten in Abhängigkeit von CIMP-Methylierungsstatus und Gabe von Chemotherapie**

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben der Patienten mit Methylierung in CA4 bei positivem bzw. negativem CIMP-Status. So überlebten die Patienten mit Methylierung in CA4 und positivem CIMP-Status im Mittel 78,74 Monate, während Patienten mit negativem CIMP-Status in dieser Gruppe 87,92 Monate überlebten. Bei negativem Methylierungsstatus von CA4 gab es nur Fälle mit negativem CIMP-Status. Diese Patienten überlebten im Mittel 87,54 Monate.

Methylierung CA4					
positiv			negativ		
CIMP-positiv	CIMP-negativ	p	CIMP-positiv	CIMP-negativ	p
78,74 (n = 30)	87,92 (n = 46)	0,789	- (n=0)	87,54 (n = 72)	-

**Tabelle 4-18: Mittleres Gesamtüberleben in Monaten in Abhängigkeit von CIMP-Status und Methylierung von CA4**

## **5 Diskussion**

### **5.1 Statistische Analyse des Ausgangskollektives**

In den nun folgenden Abschnitten wird Stellung genommen zu den Ergebnissen der statistischen Analyse des Ausgangskollektives. Der Aufbau ist analog zum Ergebnisteil.

#### **5.1.1 Prätherapeutische Behandlungssituation**

Vor Beginn der Behandlung befand sich nur ein geringer Anteil der Patienten in einem schlechten körperlichen Zustand (1,8%). Jedoch nur bei weniger als der Hälfte der Fälle war bekannt, in welcher körperlichen Verfassung sie sich befanden (siehe Abbildung 14). Daher ist die Aussage, dass sich der Großteil der Patienten in gutem körperlichen Zustand befand und der daraus resultierende Umkehrschluss nur bedingt verwertbar. Man könnte jedoch argumentieren, dass in der Praxis bei Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand eher eine standardisierte Einschätzung der Leistungsfähigkeit getroffen wird, um dies zu dokumentieren, als bei Patienten mit gutem Befinden. Wenn man diese Annahme zu Grunde legt, könnte die erhobene Verteilung der Wirklichkeit im Gesamtkollektiv in etwa entsprechen.

Obwohl sich ein nicht unwesentlicher Teil der Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium befand (26,5%), wurde in fast allen Fällen ein kuratives Behandlungsergebnis angestrebt (93,2%).

#### **5.1.2 Tumorlokalisation**

Im Vergleich zum Verteilungsmuster in der Gesamtbevölkerung hatten sich prozentual weniger Karzinome im Rektum, im Sigma und in der rektosigmoidalen Übergangszone befunden. Dafür waren mehr Tumore im Zäkum lokalisiert (127). Die Verteilung entsprach also nicht exakt dem der Gesamtbevölkerung, aber die jeweiligen Tendenzen waren ähnlich (siehe Abbildung 18).

Das Auftreten von synchronen kolorektalen Zweit- bzw. Drittkarzinomen liegt mit 7,4% nur minimal über dem in der Literatur genannten Wert von 4% (11).

Alle metastasierten Fälle wiesen eine Lebermetastasierung auf. Dies entspricht dem primären hämatogenen Metastasierungsweg bei nicht-tiefsitzenden KRK

über die Vena portae. Diesem Weg entsprechend, zeigte sich die Lunge als zweites befallenes Organ (78). Andere Metastasen lagen bei Diagnosestellung nicht vor.

### 5.1.3 Operation

Im Gegensatz zur Leistungserfassung über den ECOG, war in nahezu allen Fällen (98,2%) eine Aussage über das Operationsrisiko in Form des ASA-Score (112) getroffen worden. Bei einem nicht unerheblichen Teil der Fälle (20,4%) lag zum Zeitpunkt der ersten Operation eine weitere schwere systemische Erkrankung vor (siehe Abbildung 19).

Die R0-Resektion war das anzustrebende Ziel der Operation. Dies konnte auch bei der Mehrheit der Fälle erreicht werden (84%). In der heute gängigen Tumorchirurgie wird versucht, den Tumor als Ganzes (en-bloc) zu entfernen, sodass das Risiko einer Streuung von Tumorzellen in den Operationssitus reduziert wird. Die Fähigkeit des Chirurgen ist als unabhängiger Prognosefaktor für das Überleben des Patienten anerkannt (56). Bei 4,3 % der Fälle konnte nur eine R1-Situation erreicht werden. Eine Nachresektion konnte in keinem der Fälle erfolgen, da bereits bei der Primäroperation sehr schwierige Operationsbedingungen bestanden oder – wie in zwei Fällen – nur die Spülzytologie positiv war, was auch als R1-Situation gewertet werden muss. Leitliniengerecht muss bei einer R1-Situation zumindest eine adjuvante Therapie durchgeführt werden (126). Hier zeigen sich die Limitationen einer retrospektiven Datenanalyse. In drei Fällen konnte das weitere Prozedere nicht eindeutig erfasst werden. Diesen Patienten wurde eine Chemotherapie angeraten, aber es liegen keine Daten vor, ob diese durchgeführt wurde. Falls die Patienten bei einem Arzt zur Therapie vorstellig wurden, welcher Informationen nicht an das Tumorzentrum Regensburg weitergab, sind diese Daten für diese Studie verloren gegangen. In einem weiteren Fall konnte ermittelt werden, dass sich der Patient gegen eine adjuvanten Therapiemaßnahme entschieden hatte. Es zeigt sich, dass gelegentlich individuelle Therapieentscheidungen vom Patienten selbst oder vom Behandler getroffen werden, welche von den Leitlinien abweichen. In diesem Fall war die Entscheidung rückblickend wohl gerechtfertigt, da sich bei einer Nachuntersuchung des Patienten zwei Jahre nach Erstdiagnose kein Anzeichen für ein Rezidiv der Erkrankung gezeigt hatte. Laut einer Studie ereignen sich 40-50%

der Rezidive kolorektaler Tumore im ersten Jahr. 90% nach vier Jahren (87). Um die Entscheidung endgültig zu werten, müsste ein Intervall von fünf Jahren betrachtet werden. Diese Informationen lagen bei diesem Patienten nicht vor. Therapieentscheidungen abweichend von den Leitlinien müssen jedoch unbedingt Ausnahmen bleiben, da in den meisten Fällen die Patienten nicht profitieren. Bei den R2-Situationen waren in allen Fällen Fernmetastasen vorhanden, welche nicht operativ entfernt worden waren. Daraus ergibt sich die R2-Resektion.

Die Tumore wurden entsprechend ihrer Lokalisation und Ausdehnung chirurgisch therapiert (siehe Abbildung 20 und Tabelle 4-3). Insgesamt war der offene Zugang die bevorzugte Methode im Kollektiv. Da das Kollektiv in einem Zeitraum von 1993 bis 2004 rekrutiert wurde, ist der Zugangsweg sicherlich nicht mehr mit heutigen Daten zu vergleichen. Die Laparoskopie ist in den letzten Jahren zunehmend populärer geworden und in den Krankenhäusern der Region werden zunehmend laparoskopische Operationen auch in der Tumorchirurgie vorgenommen.

#### **5.1.4 Histologie**

Wie zu erwarten, waren die meisten Tumore Adenokarzinome (82,1%). Dies entspricht in etwa den Zahlen in der Literatur mit 85-90% (52). Als zweithäufigste Entität zeigte sich – der Literatur entsprechend – das muzinöse Adenokarzinom. Neuroendokrine Tumore stellen eigentlich eine eigenständige Tumorerkrankung dar und hätten daher in einer reinen Betrachtung des KRK nicht berücksichtigt werden dürfen. Aufgrund der Lokalisation wurde der Fall dennoch aufgenommen.

Interessanterweise wies keiner der Tumore einen guten oder einen entdifferenzierten Differenzierungsgrad auf. Die neuere Einteilung des Gradings bezieht sich auf ein zweigliedriges System. Hier werden G1/G2 Tumore als low-grade und G3/G4 Tumore als high-grade Tumore klassifiziert (31). Demnach wären nicht ganz zwei Drittel der Tumore low-grade differenziert und ca. ein Drittel high-grade.

Vom Tumorstadium und der Lymphknoteninfiltration her zeigten sich die Tumore im Kollektiv weit fortgeschritten. Der Großteil der Tumore befand sich im pT3-Stadium (66%). Ein ähnlich hoher Wert für pT3-Tumore (54,5%) wird auch aus dem Tumorregister München gemeldet. 17,9% der Tumore waren im



Ausgangskollektiv im pT4-Stadium und damit waren auch sehr weit fortgeschrittene Tumorstadien stark vertreten. Auch bei den pT4-Tumoren ist eine Vergleichbarkeit mit den Daten aus München gegeben. Hier hatten sich 15,6% im pT4-Stadium gezeigt. Lediglich im pT1-Stadium gehen die Angaben mit 0,6% im hier analysierten Kollektiv und 10,9% aus München stark auseinander. Die hier erhobenen Daten für den Nodalstatus korrelieren nicht mit den Daten des Tumorregisters in München. In München wurde eine absteigende Häufigkeit bezüglich des Nodalstatus verzeichnet. Der Großteil der Fälle ist demnach pN0 (56,3%). Im hier analysierten Kollektiv zeigen sich nur 26,5% der Tumore negativ bezüglich eines Lymphknotenbefalls. Im Gegensatz dazu zeigt sich im Ausgangskollektiv der überwiegende Teil der Tumore mit pN1 (45,7%). Das Münchner Tumorregister hingegen meldet lediglich 21,4% der Tumore im pN1-Stadium. Mit den Daten aus München deckt sich jedoch wieder die Verteilung der UICC-Stadien. So wurde auch in München am häufigsten das UICC-Stadium 3 registriert (138). Da die Daten zumindest im UICC- und pT-Stadium mit den Daten aus München korrelieren und mit 162 die Fallzahl recht groß ist, kann man davon ausgehen, dass es sich um ein realistisches Abbild der Darmkrebsneuerkrankungen in der Region von 1993 bis 2004 handelt. Interessant wäre es nun, die Zahlen in der Region ab der Einführung der Früherkennungskoloskopie im Rahmen des deutschen Früherkennungsprogrammes im Oktober 2002 im Vergleich zu diesen Daten zu sehen. Erste Zahlen zeigen, dass durch die Screeningkoloskopien in Deutschland Karzinome in einem früheren Stadium entdeckt werden können oder sogar die Verhütung der Karzinomentstehung erreicht werden kann (17). Dies würde natürlich eine rege Teilnahme der Bevölkerung an einem solchen Programm voraussetzen.

### **5.1.5 (Neo-)adjuvante Therapie**

Nur wenige Fälle waren mit einer neoadjuvanten Radiochemotherapie behandelt worden (4 Fälle). Insgesamt ist daher die Fallzahl zu klein, um eine Aussage bezüglich der Effektivität einer neoadjuvanten Therapie im Ausgangskollektiv zu treffen. Ebenso verhält es sich bei den Fällen, in denen eine adjuvante Radiotherapie durchgeführt wurde. Aus diesem Grunde wurde auf eine gesonderte Auswertung der strahlentherapeutisch behandelten Patienten verzichtet. Alle strahlentherapeutisch behandelten Patienten, bis auf einen Fall, wurden auch

chemotherapeutisch behandelt. Diese Fälle fließen im Rahmen dieser Auswertung ein.

Insgesamt wurden über die Hälfte der Patienten bei Primärdiagnose chemotherapeutisch behandelt. Eigentlich hätte, wenn man die Verteilung der UICC-Stadien im Kollektiv betrachtet (siehe Tabelle 4-7), bei mehr Patienten laut aktuell geltenden Leitlinien eine adjuvante Therapie durchgeführt werden müssen. So wäre im Stadium 3 eine adjuvante Therapie obligat (126). Tatsächlich haben jedoch nur 68,5% der Patienten in diesem Stadium eine Chemotherapie erhalten. Bei einigen Fällen könnte es möglich sein, dass eine Chemotherapie durchgeführt worden ist, ohne dass dies durch die retrospektive Datenanalyse erfasst werden konnte. In den restlichen Fällen wurde wohl keine adjuvante Therapie durchgeführt, teils auf Patientenwunsch, teils als Entscheidung des behandelnden Arztes. Bei den chemotherapeutisch behandelten Patienten wurde in beinahe allen Fällen eine 5FU-haltige Chemotherapie angewandt. Ausnahmen waren vier Patienten, welche im Rahmen einer Studie mit Panorex behandelt wurden und drei Patienten, welche mit einer Capecitabine-Monotherapie behandelt wurden. Einmalig wurde Panorex zusammen mit 5FU appliziert. Studien zeigen einen absoluten Überlebensvorteil von 10-15% unter einer Therapie mit 5FU im UICC-Stadium 3 (95). Das am häufigsten angewandte Regime war das Mayo-Protokoll [Leucovorin 20mg/m<sup>2</sup>KOF + 5FU 425 mg/m<sup>2</sup>KOF Tag 1-5, Wiederholung Tag 28 über 6 Zyklen (114)]. Dieses Schema wurde auch oft bei Patienten im UICC-Stadium 3 eingesetzt. Nach den aktuell geltenden S3-Leitlinien sollte jedoch in diesem Fall bei fehlenden Kontraindikationen eine oxaliplatinhaltige Chemotherapie angewandt werden. Nur im Stadium 2 ist eine Fluoropyrimidinmonotherapie (z. B. 5FU/Folinsäure oder Capecitabine) vorgesehen (126). Problematisch in dieser Studie ist der lange Beobachtungszeitraum, in welchem ein großer Wandel in der Applikation der Chemotherapeutika erfolgte. Man muss also davon ausgehen, dass ein Großteil der Patienten, nach heute gängigen Maßstäben, nicht adäquat behandelt wurde. Der Vorteil hingegen ist, dass zwei Gruppen von Patienten im gleichen Stadium mit und ohne Chemotherapie vorliegen. Hierdurch können vergleichende Studien z.B. über den Einfluss genetischer Marker auf die Effektivität der Chemotherapie – wie im zweiten Teil dieser Arbeit – durchgeführt werden.

### 5.1.6 CEA-Werte

Die Verlaufskontrolle des CEA-Wertes soll laut S3-Leitlinie zur Therapieüberwachung und zur Nachsorge eingesetzt werden (126). Als Screeningparameter in der asymptomatischen Bevölkerung ist dieser Tumormarker aufgrund mangelnder Sensitivität und Spezifität vor allem in der asymptomatischen Bevölkerung – wie beinahe alle Tumormarker – nicht geeignet (38). Interessanterweise war bei den Fällen im UICC-Stadium 1 der CEA-Wert nicht signifikant erhöht. Es gab jedoch auch eine beträchtliche Anzahl von Fällen mit weit fortgeschrittenen Tumorleiden, welche keine Erhöhung des CEA-Wertes aufzeigten (siehe Tabelle 4-8). Dies untermauert die vorhin beschriebene mangelnde Sensitivität. Es ergab sich jedoch eine statistische Signifikanz für den Zusammenhang, dass ein erhöhter CEA-Wert ein Indikator für ein weit fortgeschrittenes Tumorstadium ist. Dieses Ergebnis korreliert mit den Angaben in der Literatur, dass der Anteil an Patienten mit erhöhtem CEA-Wert in fortgeschrittenen Tumorstadien ansteigt (20).

Wenn man nun den Verlauf der CEA-Werte prä- und posttherapeutisch verfolgt, kann man eindeutig eine Reduktion der Höhe der CEA-Werte sehen (siehe Abbildungen 29 und 30). Dies ist verständlich, da der Tumor CEA exprimiert (46). Nach Entfernung der Tumormasse muss der CEA-Wert folglich sinken. Falls der CEA-Wert nach der Behandlung noch signifikant erhöht ist, spricht dies – abgesehen von Fällen, in denen ein falsch positives Ergebnis vorliegt – dafür, dass nicht die komplette Tumormasse entfernt worden ist. Dies war z. B. der Fall bei der Patientin mit dem postoperativen CEA-Wert von 140,7 ng/ml. In diesem Fall lagen bereits bei Diagnosestellung Leber- und Lungenmetastasen vor, welche nicht chirurgisch entfernt werden konnten. Es wurde lediglich der Primärtumor entfernt. Der CEA-Wert war zwar nach der Operation gesunken (präoperativ 175,3 ng/ml), jedoch wurde durch die Filiae weiterhin CEA vom Tumor produziert. Bei zwei weiteren Fällen war der CEA-Wert postinterventionell um die 30 ng/ml erhöht. Beide Patienten hatten Leberfiliae, welche nicht chirurgisch therapiert wurden. In einem der beiden Fälle hatte sich jedoch nach chirurgischer Resektion des Primärtumors und nach Chemotherapie ein signifikanter Rückgang des CEA-Wertes gezeigt. Beim anderen Fall hatte der Patient wohl kein Ansprechen auf die Therapie gezeigt und der CEA-Wert war unter Therapie sogar angestiegen. Auch durch andere Untersuchungen war ein Tumorprogress zu

verzeichnen gewesen. Die Chemotherapie wurde in diesem Fall abgebrochen und der Patient verstarb im Beobachtungszeitraum. Im Großteil der Fälle (85%) hatte sich der posttherapeutische CEA-Wert im Normbereich befunden. In den Fällen, in denen sich der CEA-Wert nach Therapie zwischen 5-15 ng/ml befunden hatte, ist von einer Grauzone zu sprechen. Hierbei liegt zwar keine signifikante Erhöhung des CEA-Wertes vor, aber er befindet sich auch nicht im Normbereich. Wie bereits zuvor erwähnt, ist auch die Spezifität des CEA-Wertes nur mäßig (38). Falls andere Hinweise auf einen Tumorprogress bzw. -persistenz fehlen, sollte an diesem Wert alleine keine Therapieindikation gestellt werden, aber die Nachbeobachtung des Patienten intensiviert werden (126). Insgesamt hat sich aus den Daten gezeigt, dass der CEA-Wert einen guten Verlaufsparemeter darstellt, aber aufgrund der mangelnden Sensitivität und Spezifität nicht alleine zur Therapieevaluation herangezogen werden kann.

### **5.1.7 Rezidive**

Obwohl insgesamt ein recht weit fortgeschrittenes Tumorstadium im Ausgangskollektiv bei Erstdiagnose vorlag, blieben 70,4% der Patienten rezidivfrei im Beobachtungszeitraum. Das bedeutet, dass diese Patienten durch die Therapie geheilt wurden. Hier muss wieder darauf hingewiesen werden, dass es sich bei der Datenerhebung um eine retrospektive Analyse handelt und eventuell einige Rezidive nicht erfasst wurden, falls sich die Patienten in einem anderen Krankenhaus oder bei einem niedergelassenen Onkologen vorgestellt hatten und die Informationen nicht an das Tumorzentrum Regensburg weitergeleitet wurden.

Bei einem Drittel der Patienten wurde ein Rezidiv verzeichnet. In einer Metaanalyse von Patienten mit KRK nach kurativ intendierter Operation hatten sich Rezidivraten von 19-57% gezeigt (36). Das hier analysierte Kollektiv liegt also mit 29,6% im unteren mittleren Bereich, obwohl in diesem Wert auch die palliativen Fälle eingeschlossen sind. Vorrangig handelte es sich um Fernmetastasen als Ausdruck eines Rezidivs. Hauptort der Fernmetastasierung war die Leber (47,7%). Sehr häufig (13,6%) traten auch Peritonealkarzinosen auf. Auch in der Literatur wird die Lebermetastasierung am häufigsten beobachtet (33%). Zweithäufigste Manifestation eines Rezidivs sind laut Literatur

Lungenmetastasen mit 22% (40). Mit 9,1% war die Inzidenz an Lungenmetastasen im Ausgangskollektiv deutlich geringer.

### 5.1.8 Rezidivfreies Überleben

Wie zu erwarten, war bei Patienten mit weit fortgeschrittenem Tumorstadium die Rezidivwahrscheinlichkeit höher, als bei Patienten mit lokalisiertem Befund bei Erstdiagnose (siehe Abbildung 34). Die Patienten, welche bereits im UICC-Stadium 1 identifiziert wurden, konnten alle geheilt werden. Im UICC-Stadium 4 zeigten 78,6% der Fälle einen Progress der Erkrankung im Beobachtungszeitraum. Somit konnte bei 3 Fällen (21,4%) trotz des weit fortgeschrittenen Tumorstadiums ein sehr guter Therapieerfolg verzeichnet werden. Im UICC-Stadium 3 blieb über die Hälfte rezidivfrei, obwohl – wie bereits oben erwähnt – nach den aktuellen Leitlinien nicht optimal therapiert wurde. Im Stadium 2 blieben sogar drei Viertel der Patienten rezidivfrei.

Interessanterweise ergab sich kein Unterschied bezüglich der Rezidivrate bei Patienten mit G2- und G3-differenzierten Tumoren (siehe Abbildung 35). Patienten mit high-grade Tumoren hatten also die gleiche Rezidivhäufigkeit, wie Patienten mit low-grade Tumoren. Eigentlich hätte man erwartet, dass aggressivere Tumore eher Rezidive hervorbringen würden. Das Differenzierungsstadium ist ein unabhängiger prognostischer Faktor. So ist eine schlechte Differenzierung in der Literatur mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (23).

Selbsterklärend ist wohl der Zusammenhang, dass Patienten mit makroskopisch oder mikroskopisch verbliebenem Tumorrest einen geringeren Zeitraum bis zum Rezidiv aufwiesen, als Patienten mit komplett entfernter Tumormasse (siehe Abbildung 36). Es ist jedoch anzumerken, dass eine R1-Resektion gegenüber der R2-Resektion eine bedeutende Verlängerung des rezidivfreien Überlebens gezeigt hatte.

Bezüglich der Auswertung der Lymph- und Blutgefäßinfiltration in Korrelation zum rezidivfreien Überleben ist anzumerken, dass hier die Fallzahl sehr gering ist. Bei beiden Betrachtungen ergab sich kein signifikanter Unterschied im rezidivfreien Überleben, obwohl das mittlere Überleben in Monaten in den jeweiligen Gruppen deutlich divergiert (siehe Abbildungen 37 und 38). Die

fehlende Signifikanz muss wohl mit der geringen Fallzahl begründet werden. Lymph- und Blutgefäßeinbrüche sind vergleichsweise neue Parameter, welche vom Pathologen begutachtet werden. Eine standardmäßige Bewertung der Gefäßinfiltration wird in den S3-Leitlinien noch nicht gefordert (126). Eine Infiltration der Blut- oder Lymphgefäße ist in der Literatur mit einer schlechteren Prognose assoziiert (94).

### 5.1.9 Overall Survival

Die Betrachtung des Overall Survival zeigt eine weitere Schwierigkeit der Datenanalyse auf. Die gemeldeten Todesursachen entsprechen rein den subjektiven Wahrnehmungen des Arztes, welcher den Totenschein ausgestellt hatte. Keiner der Patienten war obduziert worden. Oft konnte die Todesursache nicht ermittelt werden. Bei 58,3% der Fälle wurde zwar eine tumorbedingte Todesursache vermutet, aber ein Beweis war nicht zu erbringen. Somit wird zusammengekommen bei 81,2% der Fälle ein Tod aufgrund der Tumorerkrankung vermutet oder gilt als bewiesen. Beinahe ein Drittel der Patienten im Ausgangskollektiv verstarb. Anzumerken ist, dass nur ein Patient im Kollektiv an Behandlungskomplikationen verstarb.

Die Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland werden von den einzelnen Tumorzentren und Tumorregistern gepflegt. Hier werden nun Angaben vom Tumorzentrum Erlangen (59), Tumorregister München (138) und Tumorzentrum Rheinland-Pfalz (117) mit den in dieser Arbeit erhobenen Werten verglichen. Zum internationalen Vergleich werden die SEER-Daten vom National Cancer Institute (USA) (97) herangezogen. Alle Angaben beziehen sich auf 5-Jahres-Überlebensraten. In dieser Arbeit beziehen sich die Überlebensraten jedoch auf den gesamten Beobachtungszeitraum (0-140 Monate, Median 45 Monate). Hierdurch ist zwar keine exakte Vergleichbarkeit gegeben, die Tendenzen zeichnen sich jedoch deutlich ab. In den Tumorregistern und -zentren waren im UICC-Stadium I 5-Jahres-Überlebensraten von > 80,1% verzeichnet worden. Im Ausgangskollektiv hatten alle Patienten (100%) in diesem Stadium überlebt. Im UICC-Stadium 2 zeigten sich mit 87,5% Überlebensrate im Ausgangskollektiv vergleichbare Werte mit den Daten aus Rheinland-Pfalz (87,8%) und Erlangen (85%). In München war mit 67% die geringste 5-Jahres-Überlebenquote in diesem Stadium ermittelt worden. In den SEER-Daten wurde nicht zwischen

UICC-Stadium 1 und 2 differenziert. So wird dort im lokalisierten Stadium ( $\hat{=}$  UICC-Stadium 1+2) eine 5-Jahresüberlebensrate von 90,1% beschrieben. Mit 61,8% entspricht die Überlebensrate im UICC-Stadium 3 den von den nationalen und internationalen Studien erhobenen Werten von 49,9%-69,2%. Lediglich im UICC-Stadium 4 differierten die Werte stark. So werden in den Studien 5-Jahres-Überlebensraten von 8,5%-11,7% beschrieben, während in dem hier untersuchten Kollektiv 50% der Patienten im Beobachtungszeitraum überlebten (59,97,117,138). Wie bereits erwähnt, entsprach der mediane Beobachtungszeitraum mit 3,75 Jahren nicht einem 5-Jahres-Intervall, doch wurden Todesdaten dem Tumorzentrum Regensburg im Jahre 2009 entnommen. Dies sind genau fünf Jahre nach dem letzten Einschluss der Fälle. Unter der Annahme, dass dem Tumorzentrum Regensburg alle oder zumindest die meisten Todesfälle gemeldet wurden, liegt also bezüglich der Sterblichkeit ein Nachbeobachtungszeitraum von mindestens fünf Jahren vor. Daher sind die Daten aus der Literatur und die Daten im Ausgangskollektiv gut vergleichbar und es kann postuliert werden, dass insgesamt ein ähnliches und im Stadium IV sogar besseres Gesamtüberleben erreicht wurde, als in der Gesamtbevölkerung.

Wie zuvor bei der Betrachtung des rezidivfreien Überlebens, war auch in der Auswertung des Gesamtüberlebens – korreliert mit dem Grading der Tumore – kein signifikanter Unterschied im Überleben vorhanden (siehe Abbildung 42). Zwar überlebten die Patienten mit gut differenzierten Tumoren im Mittel etwas länger, als die Patienten mit G3-Tumoren, aber signifikant war dieser Unterschied nicht. Dieses Ergebnis ist sehr verwunderlich und entspricht nicht dem in der Literatur angegebenen negativem Prognosefaktor bei schlecht differenzierten Tumoren (23).

Naturgemäß ist bei Patienten mit einem oder mehreren Rezidiven die Lebenserwartung stark verringert im Gegensatz zu Patienten ohne Rezidiv (siehe Abbildung 43). Nicht einmal ein Drittel der Patienten mit einem Rezidiv überlebten im Beobachtungszeitraum. Wenn man dann noch die Fälle unterteilt in die Anzahl der Rezidive bzw. Entwicklung von Zweittumoren, sieht man recht eindrücklich, dass die Lebenserwartung mit jedem neuen Progress stark abnimmt (siehe Abbildung 44). Das Auftreten eines einzigen Rezidives wurde jedoch von über der Hälfte der Patienten überlebt. Diese Daten zeigen, dass zwar die Aussichten auf eine Heilung stark reduziert sind, aber dass dennoch eine

Remission oder zumindest eine Eindämmung des Tumorprogresses auch bei einem Rezidiv noch möglich ist. Bei einer second-line-Therapie werden in der Literatur Remissionsraten von ca. 10 % und eine Kontrolle des Tumorwachstumes in ca. 50% der Fälle bei entsprechenden Therapieregimen beschrieben (111,121,132). Für die second-line-Therapie entsprechen die vorliegenden Daten also den angegebenen Werten in der Literatur. Für third-line-Therapie oder sogar weitere Therapien liegen keine Daten vor.

Bei der first-line-Therapie im Ausgangskollektiv konnte ein signifikanter Unterschied im Überleben bei Fällen im UICC-Stadium 3 mit und ohne Chemotherapie ermittelt werden (siehe Abbildung 46). Das mittlere Überleben wurde um 26 Monate verlängert. Es verstarben signifikant weniger Patienten mit Chemotherapie als ohne. Wie zuvor bereits erwähnt, wird in den aktuellen Leitlinien im UICC-Stadium 3 eine Chemotherapie empfohlen (126). Dies kann durch die vorliegenden Daten bestätigt werden. Leider war es aufgrund der geringen Fallzahl im UICC-Stadium 2 nicht möglich, eine Auswertung bezüglich Überlebensvorteil durch Chemotherapie durchzuführen. Gerade in diesem Stadium wäre eine Differenzierung interessant gewesen, da hierfür keine eindeutigen Empfehlungen vorliegen.

Während kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem mittleren Überleben und dem ASA-Score aufgezeigt werden konnte (siehe Abbildung 47), wurde ein Zusammenhang mit der Leistungsfähigkeit des Patienten, eingeteilt mittels ECOG, festgestellt (siehe Abbildung 48). Dieser Sachverhalt ist verwunderlich. Der ASA-Score wird verwendet, um das relative Operationsrisiko eines Patienten festzustellen (112). Hierfür werden die Erkrankungen eines Patienten herangezogen. Der ECOG hingegen beschreibt die Leistungsfähigkeit eines Patienten (109). Man sollte vermuten, dass die Nebendiagnosen eines Patienten die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit ähnlich beeinflussen wie die Leistungsfähigkeit. Trotz der fehlenden Signifikanz ist jedoch auch beim ASA-Score ein Trend ersichtlich. Das mittlere Überleben war mit ASA-Score 1 um ca. 21 Monate länger als mit ASA-Score 2. Der gleiche Zeitraum zeigte sich bei ASA-Score 2 und 3.

Ein eindeutiges Ergebnis zeigte sich in der Korrelation des Gesamtüberlebens mit der Therapieintention (siehe Abbildung 49). Bei Patienten mit palliativer



Zielsetzung war das mittlere Überleben signifikant geringer als bei Patienten mit kurativer Therapieindikation. Trotzdem überlebten nur 68,5% der Patienten mit kurativer Zielsetzung bei Erstdiagnose.

## 5.2 Methylierungsanalyse von CA4

Es wird darauf hingewiesen, dass sich die Daten der Methylierungsanalyse von CA4 auf eine homogene Gruppe von Patienten im UICC-Stadium 3 beziehen. Hierdurch kann eine gute Vergleichbarkeit erreicht werden.

Interessanterweise hatte sich eine beinahe gleichmäßige Verteilung der positiv und negativ methylierten Fälle bei CA4 gezeigt. Der Cut-off-Wert von 10% war ein empirischer Wert. Auch bei p16 wurde 10% als Cut-off-Wert angesetzt. Bei SOCS1, RUNX3, IGF2 und Neurog1 hingegen konnte mit 5% ein niedrigerer Cut-off-Wert festgelegt werden, da recht eindeutige Methylierungswerte bei der Analyse vorlagen. Durch die individuelle Wahl der Cut-off-Werte sollten falsch positive Ergebnisse verhindert werden. Hierdurch ist es jedoch möglich, dass einige positive Fälle nicht erfasst wurden. Bei der QESD (14) handelt es sich um eine noch selten verwendete Methode, um den Methylierungsstatus zu untersuchen. Die bisherigen Standardmethoden zur Analyse der Methylierung erforderte die chemische Modifikation von Cytosin zu Uracil durch Verwendung von Bisulfit (54). Um den Methylierungsstatus zu bestimmen, wird bei einigen der Bisulfitmethoden die „Percentage of methylated reference“ (PMR) errechnet, sodass eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse erreicht werden kann. Hierfür wird eine M.SssI (= CpG-Methyltransferase)-behandelte DNA als konstante Referenz verwendet. Durch eine Formel 
$$\left[ 100 \times \frac{(\text{Methylierungsreaktion} / \text{Kontrollreaktion})_{\text{Probe}}}{(\text{Methylierungsreaktion} / \text{Kontrollreaktion})_{\text{M.SssI-Referenz}}} = \text{PMR} \right]$$
 kann die PMR errechnet werden. (29,145). Die PMR entspricht jedoch nicht dem prozentualen Anteil der Methylierung (30). In mehreren Studien wurde ein PMR Cut-off-Wert von  $> 4$  für eine positive Methylierung festgelegt (29,62,103). Andere Studien hingegen verwendeten einen PMR Cut-off-Wert von  $> 10$  (30,145). Dies zeigt, dass es auch bei diesen häufig verwendeten Methoden kein standardisiertes Verfahren zur Festlegung des CIMP-Status eines Markers vorhanden ist. Um einheitliche und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, sollten jedoch bei allen Methoden standardisierte Methoden zur Bestimmung der Methylierung etabliert werden. Vorteile der in dieser Arbeit verwendeten

Analysemethode zur Bestimmung der Methylierung bestehen sicherlich in der Schnelligkeit der Durchführung. Es kann in kurzer Zeit eine große Anzahl an Proben untersucht werden. Außerdem können sich durch die Verwendung von Bisulfit Bedingungen einstellen, welche Teile der DNA degradieren könnten (50). Dieses Problem besteht bei der QESD nicht, da auf Bisulfit verzichtet werden kann.

### **5.2.1 Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten**

Obwohl Promotorhypermethylierung einen normalen Prozess der Alterung darstellt (4), zeigt sich bei den über 70-jährigen Patienten kein erhöhtes positives Methylierungsprofil von CA4. In beiden Gruppen war die Verteilung von positiven und negativen Fällen in etwa gleich (siehe Tabelle 4-9). Die vorliegenden Daten zeigen also, dass Alter keinen Einfluss auf die Promotormethylierung von CA4 hat.

Ebenso verhält es sich mit dem Tumorstadium. Auch hier zeigte sich ein relativ homogenes Verteilungsmuster im Methylierungsprofil innerhalb der unterschiedlichen Tumorstadien (siehe Tabelle 4-9). Die Promotormethylierung von CA4 ist also nicht mit dem Tumorstadium assoziiert. In der Literatur wird die Promotorhypermethylierung als frühes Ereignis in der Entstehung eines KRK beschrieben und stellt somit einen Marker als Hinweis auf die Transformation von Adenom zum Karzinom dar (3). Auch wurden spezifische Promotormethylierungen mit verschiedenen Tumorstadien bzw. -größe assoziiert (69,125). Dies trifft jedoch nicht für die Promotormethylierung von CA4 zu. Durch diese Daten könnte vermutet werden, dass die Promotormethylierung von CA4 ein relativ frühes Ereignis in der Tumorentstehung ist.

Interessanterweise waren von den G3-Tumoren deutlich mehr Fälle methyliert, während bei den G2-Tumoren der negative Methylierungsstatus überwog (siehe Abbildung 51). Unter den CIMP-Markern konnte in der Literatur eine Korrelation von schlechtem Differenzierungsgrad und positivem CIMP-Status nachgewiesen werden (125,141). Diese Beobachtung lässt sich also auch für die Promotormethylierung von CA4 bestätigen.

### **5.2.2 Korrelation mit molekularen Charakteristika**

Es gibt sehr viele Studien, welche den CIMP-Status von Tumoren mit MSI, CIN, KRAS- und BRAF-Mutationen korrelieren. Es ist sehr sinnvoll molekulare

Charakteristika zu vergleichen, da so Hinweise auf die Pathogenese gewonnen werden können. Molekulare Subtypen von Tumoren können so entdeckt oder nachgewiesen werden. Eventuell können durch diese Korrelationen auch Fehlschlüsse verhindert werden. Desweiteren ist es hierdurch möglich, Ersatz- bzw. Referenzmarker, welche durch einfachere Methoden zu untersuchen sind, zu identifizieren; Übersicht in (102).

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellt die schrittweise Veränderung molekularer Strukturen einen wesentlichen Bestandteil in der Entstehung des KRK dar (35). Die Tumorgenese wird durch mindestens eine Art der genetischen Instabilität angestoßen. Neben CIMP sind dies CIN und MSI (82); und Übersicht in (66). Die meisten Tumore mit MSI zeigen keine chromosomale Instabilität (CIN) auf (34).

Chromosomale Instabilität (CIN) verursacht genetische Deletionen, Duplikationen und Neuaneordnungen im Nukleus der Tumorzellen, was sich als Aneuploidie und häufig auch als „Loss of heterozygosity“ (LOH) manifestiert. Die molekularen Grundlagen hinter CIN sind noch nicht vollständig geklärt (45,82). Goel et al. 2007 und Cheng et al. 2008 zeigten auf, dass CIMP-positive Tumore invers korreliert sind mit CIN. Dies bedeutet, dass Tumore mit positivem CIMP-Status weniger chromosomale Aberrationen aufweisen als CIMP-negative. Hierdurch kann vermutet werden, dass zwei verschiedene Grundlagen für die genetischen bzw. epigenetischen Veränderungen ursächlich sind (22,45). Hier muss jedoch zwischen CIMP-high und CIMP-low unterschieden werden. CIMP-low weist häufiger CIN auf als MSI; Übersicht in (47). Bei Korrelationen zwischen dem Methylierungsstatus von CA4 und CIN zeigte sich keine statistische Signifikanz. Es hatte sich eine relativ ausgewogene Verteilung von Methylierungsstatus und CIN-Status gezeigt (siehe Tabelle 4-10). Die nachgewiesene inverse Korrelation von CIMP und CIN ist demnach bei der Promotormethylierung von CA4 nicht ersichtlich.

Bei Korrelation des Mikrosatellitenstatus zum Methylierungsstatus von CA4 (siehe Tabelle 4-10) hingegen, zeigte sich eine eindeutige Signifikanz. Mikrosatelliteninstabilität (MSI) resultiert aus einer Inaktivierung des DNA-Mismatch-Repair-Systems. Dadurch können bestimmte Mutationen in kurzen repetitiven Basensequenzen, den Mikrosatelliten, nicht korrigiert werden. Es folgt

oft eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, z.B. durch Frameshift-Mutationen (27). CIMP-positive Tumore zeigen sehr häufig MSI auf (45); und Übersicht in (47). Je höher der CIMP-Status (CIMP-high), desto höher ist auch die Korrelation mit der Mikrosatelliteninstabilität (10). In der Übersichtsarbeit von Grady 2010 wird bei CIMP-low Tumoren eine vergleichbar geringe Assoziation mit Mikrosatelliteninstabilität beschrieben, wie bei Non-CIMP-Fällen. Es wird angenommen, dass es sich bei CIMP-low-Tumoren um eine weitere Untergruppe an Karzinomen handelt, mit dementsprechend unterschiedlichem klinisch-pathologischen Profil (47). Hierüber müssen jedoch erst weitere Studien durchgeführt werden, da in den meisten Studien bisher die Unterscheidung in CIMP-low und -high nicht erfolgt war. Man geht davon aus, dass ungefähr die Hälfte der CIMP-positiven Tumore auch MSI-positiv sind, was durch ein methylierungs-induziertes Silencing des hMLH1-Mismatch-repair-Genes begründet wird. Dieser epigenetischen Veränderung liegen viele Fälle von Mikrosatelliteninstabilität zugrunde (71). Obwohl in den analysierten Fällen insgesamt nur sehr wenige Fälle MSI waren (11%, 16 Fälle), wiesen jedoch die in CA4 positiv methylierten Tumore signifikant mehr MSI auf, als die negativen Fälle. Die Promotormethylierung von CA4 zeigt also in Bezug auf den Mikrosatellitenstatus eine ähnliche Korrelation wie der CIMP-Status. In der Literatur wird ein deutlich vermindertes Überleben in den seltenen Fällen mit MSS und CIMP-high beschrieben (10).

KRAS und BRAF sind Protoonkogene, welche Einfluss auf das Zellwachstum und die -proliferation haben. Mutationen der beiden Gene werden sehr oft im KKK gefunden (KRAS-Mutationen 30-40% (110), BRAF-Mutationen 5-22% (58,85). KRAS- und BRAF-Mutationen sind signifikant öfter in CIMP-positiven Tumoren nachweisbar, als in CIMP-negativen (137); und Übersicht in (47). Wobei auch hier wieder – ähnlich wie beim Mikrosatellitenstatus und CIN – eine Unterscheidung in CIMP-low und -high gefordert wird. So zeigen sich auch hier deutliche Unterschiede im genetischen Profil. CIMP-low-Tumoren weisen bezüglich BRAF hauptsächlich den Wildtyp auf, während KRAS mutiert ist. Bei CIMP-high-Tumoren ist dies genau umgekehrt. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass es sich bei CIMP-high- und CIMP-low-Tumoren um unterschiedliche Subgruppen des KKK handelt; Übersicht in (47). Bei der Methylierungsanalyse von CA4 hatten sich keine signifikante Korrelationen mit BRAF- oder KRAS-

Mutationen ergeben. Bei BRAF hatte sich jedoch ein eindeutiger Trend gezeigt. Von 8 mutierten Fällen waren 6 methyliert in CA4. Hier kann jedoch aufgrund der geringen Fallzahl keine Signifikanz abgeleitet werden (siehe Tabelle 4-10).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Fälle mit positiver Methylierung in CA4 – ähnlich der Fälle mit CIMP-high – signifikant häufiger MSI-H sind, in KRAS den Wildtyp aufzeigen und tendenziell (jedoch nicht signifikant) häufiger in BRAF mutiert sind. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass eine Methylierung in CA4 eine weitere Eigenschaft der CIMP-high-Tumoren darstellt oder auch, dass CA4 ein eigenständiger Marker für CIMP-high-Tumoren ist.

### 5.2.3 Korrelation mit p53-Status

In dieser Arbeit werden Daten verwendet, in denen der p53-Status mittels immunhistochemischen Methoden ermittelt wurde. p53 ist ein bekannter und gut untersuchter Tumorsuppressor (12). Eine Mutation im p53-Gen ist – wie bereits oben erwähnt – ein wesentlicher Bestandteil in der Entwicklung des KKR (35). Interessanterweise werden p53-Mutationen signifikant häufiger in CIMP-negativen Fällen gefunden (137). Es gibt nur wenige Arbeiten, in denen die Expression von p53, ermittelt durch immunhistochemische Methoden, mit dem CIMP-Status verglichen wird. Ogino et al. zeigte jedoch, dass – ähnlich der p53-Mutationsanalyse – ebenfalls eine inverse Korrelation von CIMP-Fällen und der p53-Expression vorliegt. Dies bedeutet, dass eine Methylierung der CIMP-Marker (CIMP-high) signifikant öfter in p53-negativen Tumoren nachgewiesen wurde (100). Ähnlich wie bei den CIMP-Markern, zeigte sich auch in dieser Arbeit bei unmethylierten Fällen von CA4 ein signifikant höherer Nachweis von p53 als bei den methylierten Tumoren (siehe Tabelle 4-11). Somit kann also auf der immunhistochemischen Ebene gezeigt werden, dass – ähnlich wie beim CIMP-Status – eine Veränderung innerhalb von p53 häufiger bei unmethylierten Promotoren von CA4 vorkommt. Zur Methodik ist jedoch kritisch anzumerken, dass hierdurch nicht alle Mutationen erfasst werden. Hintergrund der Immunhistochemie ist, dass in normalem Gewebe Wildtyp p53 aufgrund einer raschen Elimination nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist. In diversen Situationen, wie z.B. Hypoxie, Azidität, Entzündung, bei veränderter DNA oder Störung der Funktion von Wachstumssignalen, akkumuliert dieses Protein jedoch im Gewebe. Eine weitere dieser Ursachen ist die Tumorgenese (12). Studien

belegen jedoch, dass, im direkten Vergleich mit der häufig verwendeten PCR-SSCP der betreffenden DNA-Abschnitte, nicht alle Mutationen im p53-Gen erfasst werden, da nicht alle Veränderungen Einfluss auf die Halbwertszeit von p53 haben (24).

### 5.3 Methylierungsanalyse der CIMP-Marker

Ähnlich wie bei der Methylierungsanalyse von CA4, wurde auch bei den CIMP-Markern ein Cut-off-Wert gewählt, welcher sich an den Ergebnissen orientiert hatte. Wie bereits zuvor erwähnt, kann dies zu falsch negativen Fällen oder falls der Cut-off-Wert zu niedrig angelegt wurde, zu falsch positiven Werten führen. Als Marker wurde das von Weisenberger et al. vorgeschlagene Panel bestehend aus CACNA1G, IGF2, Neurog1, RUNX3 und SOCS1 verwendet (145). CACNA1G wurde jedoch gegen p16 ersetzt. Die Daten für Neurog1 und IGF2 lagen – wie bereits erwähnt – vor. Ein Tumor wird nach Weisenberger als CIMP-positiv betrachtet, wenn mindestens drei der fünf Marker positiv sind (145). Problematisch ist, dass es zum aktuellen Zeitpunkt noch keinen Konsensus gibt, welche Marker zur Erfassung von CIMP verwendet werden sollten. Ein standardisiertes Panel ist auch heute noch nicht vorhanden; Übersicht in (60). Die experimentellen Arbeiten zur Methylierungsanalyse von CA4 begannen zu einem Zeitpunkt, als die verwendeten Marker nach Weisenberger als hinreichend zur Identifizierung von CIMP galten. Im Bereich der CIMP-Forschung gab es in den letzten Jahren einen großen Wandel. Insbesondere wird eine Unterteilung in CIMP-high und -low, bzw. No-CIMP als nötig befunden; Übersicht in (47). Ogino et al. zeigten 2007 auf, dass ein Panel zur CIMP(-high)-Analyse mindestens aus RUNX3, CACNA1G, IGF2 und MLH1 bestehen sollte. Hiervon wurden in dieser Arbeit nur zwei Marker verwendet. Es wurde durch Ogino jedoch auch die Validität der anderen hier verwendeten Marker p16, SOCS1 und Neurog1 bestätigt (104). Neben der Auswahl der Marker besteht jedoch noch ein weiteres Problem der CIMP-Analyse. Ein positiver CIMP-Status wurde z.B. von Weisenberger festgelegt, wenn drei aus fünf Marker positiv sind (145). Aber ebenso wie beim Panel der CIMP-Marker, existiert auch bei der Anzahl der positiven Marker kein Standard, welcher den CIMP-Status definiert. Da sich das Panel der CIMP-Marker, welches in dieser Arbeit benutzt wurde, an dem Panel von Weisenberger et al. orientiert, wird ein positiver CIMP-Status ab drei

positiven CIMP-Markern angenommen. Da nur fünf CIMP-Marker zur Verfügung standen, wurde eine Unterteilung in CIMP-high und -low als nicht sinnvoll erachtet. Es zeigten sich 20,4% (30 Fälle) als CIMP-positive Tumoren. In anderen Studien hatten sich 15-18% CIMP-positive Tumoren beim KRK gezeigt (101,104,145). Damit hatten sich im vorliegenden Kollektiv leicht höhere, aber vergleichbare Werte gefunden.

Bezeichnenderweise hatten sich in dem analysierten Kollektiv bezüglich der CIMP-Marker beinahe exakt die gleichen prozentualen Methylierungswerte gefunden wie in anderen Studien. In dem von Barault et al. analysierten Kollektiv war mit ebenfalls 26% exakt die gleiche prozentuale Häufigkeit an positiv methylierten Fällen in p16 gefunden worden. Neben p16 wurden in dieser Studie hMLH1, MINT1, MINT2 und MINT31 analysiert. Somit ergaben sich keine weiteren Überschneidungen in den Markern. Barault definierte zur Festlegung des CIMP-Status drei Subgruppen. Es wurde festgelegt, dass bei 4-5 positiven CIMP-Markern CIMP-high, bei 1-3 positiven Markern CIMP-low und bei fehlender Methylierung No-CIMP vorlag (10). Bei Ogino et al. war mit 30% ein ähnlicher Wert in der Methylierung von p16 gefunden worden. Ähnlich verhielt es sich mit den Methylierungsanalysen von RUNX3 (20% bei Ogino vs. 18%) und SOCS1 (17% bei Ogino vs. 12%). Auch bei IGF2 zeigten sich exakt die gleichen prozentualen Methylierungswerte (24% bei Ogino vs. 24%). Lediglich bei Neurog1 unterschieden sich die Werte gering (30% bei Ogino vs. 45%). In der Analyse von Ogino waren mit CACNA1G, CRABP1 und MLH1 noch weitere Marker untersucht worden. Es wurde eine Unterteilung in CIMP-low (1-5/8), CIMP-high ( $\geq 6/8$ ) und CIMP-0 (0/8) getroffen (104). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist aufgrund unterschiedlicher Methoden der Analyse nur eingeschränkt gegeben. Insgesamt hatten sich jedoch mit der hier verwendeten Analysemethode des Methylierungsstatus realistische Werte abgezeichnet. Die Ähnlichkeit der Ergebnisse ist umso erstaunlicher, da bei epigenetischen Veränderungen oft auch regionale bzw. ethnische Unterschiede eine große Rolle spielen (92). Bei Ogino stammte das untersuchte Kollektiv aus dem Raum Boston (USA), während es sich bei Barault um Patienten aus dem Gebiet der Côte-d'Or (Frankreich) handelte (10,104).

## 5.4 Korrelation von CA4- und CIMP-Methylierung

In diesem Abschnitt soll geklärt werden, ob CA4 nur ein weiterer CIMP-Marker ist oder ob es sich dabei um einen eigenständigen prognostischen Marker handelt. Da ein Panel aus drei CIMP-Markern eine zu geringe Aussagekraft besitzt, wurden – wie bereits oben erwähnt – zwei weitere Marker (IGF2 und Neurog1) aus einer anderen Arbeit am gleichen Kollektiv ergänzt.

Es hatte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Methylierung von CA4 und allen analysierten CIMP-Markern gezeigt (siehe Tabelle 4-12). Bei einer Gegenüberstellung der einzelnen CIMP-Marker und CA4 zeigten sich recht häufig beide Promotoren methyliert (11,5% bei SOCS1, 16,9% bei RUNX3, 21,8% bei IGF2, 33,1% bei Neurog1 und 19,6 % bei p16, siehe Tabelle 4-13). Damit gibt es also einige Fälle, in denen die Methylierung von CA4 mit dem CIMP-Pathway zusammenhängt. Wenn sich mehr als zwei CIMP-Marker als positiv methyliert zeigten – womit laut der hier verwendeten Definition von einem positiven CIMP-Status des Tumors ausgegangen wird –, war in keinem der Fälle eine negative Methylierung in CA4 nachzuweisen. Es gibt auch nur wenige Ausnahmen, in denen CA4 nicht methyliert war und der CIMP-Marker schon. Damit muss CA4 auch zu den CIMP-Markern gezählt werden. Auf der anderen Seite gab es jedoch viele Tumoren, welche in CA4 methyliert waren, aber in den hier analysierten CIMP-Markern nicht. Insgesamt lag in 32,9% der Fälle eine Methylierung des Promotors von CA4 vor, aber kein einziger der CIMP-Marker war methyliert. Dies lässt auf einen zusätzlichen Weg schließen, wodurch die Methylierung von CA4 angestoßen wird. Die Frage ist also nun, wodurch diese Fälle, also die Fälle, in denen eine Methylierung in CA4 vorliegt, aber keiner der analysierten CIMP-Marker positiv ist, erklärt werden können und welche klinische Konsequenzen daraus resultieren. Im folgenden Abschnitt werden die Auswirkungen der Promotormethylierung von CA4 auf das Überleben und die Rezidivhäufigkeit beleuchtet und mit den CIMP-Markern verglichen, um die Frage nach den klinischen Konsequenzen zu diskutieren.

## 5.5 Progressionsfreies und Overall Survival

Alle Fälle zusammengekommen, ergibt sich kein Unterschied zwischen den methylierten und nichtmethylierten Fällen (CA4) im progressionsfreien Überleben



(siehe Abbildung 57) oder im Gesamtüberleben (siehe Abbildung 60). Trifft man jedoch eine Unterteilung der Fälle in Patienten mit und ohne Chemotherapie, zeigen sich signifikante Unterschiede. Dies ist auch das bedeutendste Ergebnis dieser Arbeit. Patienten mit Methylierung von CA4, welche eine Chemotherapie erhalten hatten, lebten signifikant länger und auch länger progressionsfrei, als Patienten ohne Chemotherapie und positivem Methylierungsstatus ( $p=0,010$ ) (siehe Abbildungen 58 und 61). Diese Patienten hatten also eindeutig von der Chemotherapie profitiert. Bei den negativ methylierten Fällen hingegen, zeigte sich keine Unterscheidung im Überleben bzw. der Rezidivhäufigkeit in Fällen mit und ohne Chemotherapie (siehe Abbildungen 59 und 62). Diese Patienten mussten sich also einer nebenwirkungsreichen Chemotherapie unterziehen, ohne dass hierdurch ein Überlebensvorteil für sie erreicht werden konnte. Welchen Einfluss gerade die Stilllegung des CA4-Genes auf die Verstoffwechslung der Chemotherapeutika hat, ist unklar. Studien an CA IX und XII hatten gezeigt, dass diese Proteine in bestimmten Tumoren durch eine Mutation im VHL-Gen überexprimiert sind, während bei CA I und II die Aktivität von normalem Gewebe über Adenome bis hin zum Karzinom abnimmt. CA IX wurde insbesondere in Tumoren aus dem GI-Trakt nachgewiesen; Übersicht in (74). Die Carboanhydrasen sind also in irgendeiner Form an der Tumorgenese beteiligt oder werden dadurch beeinflusst. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, unterscheiden sich die Carboanhydrasen in ihren Lokalisationen. CA IX und XII sind membrangebunden, während sich CA I und II intrazellulär befinden (37,64). Damit ergeben sich auch unterschiedliche Mechanismen und Funktionen. CA IV stellt eine Sonderform in der Familie der Carboanhydrasen dar. Nur diese Isoform ist mit einem Glycosylphosphatidylinositolanker mit der Membran verbunden (64). Leider gibt es insgesamt nur wenige Studien, die CA IV betrachten, aber wenn man die unterschiedlichen Reaktionen der anderen Carboanhydrasen in Tumoren betrachtet, wird man nicht um eine genaue Erforschung des Mechanismus von CA IV umhinkommen, da kein Rückschluss von anderen Carboanhydrasen gezogen werden kann. Fakt ist jedoch, dass Carboanhydrasen auf den pH-Wert Einfluss nehmen. In Tumoren wird generell eher ein saurerer pH-Wert gefunden, welcher auch Einfluss auf die Entwicklung der Tumorzelle nehmen kann; Übersicht in (74). Auch die Verstoffwechslung von Medikamenten wie Chemotherapeutika ist pH-abhängig. In Studien konnte eine Abhängigkeit

vom pH-Wert bei der Aufnahme von 5-FU in Tumorzellen nachgewiesen werden (108). Man könnte nun mutmaßen, dass die Stilllegung von CA4 und die damit resultierende Downregulation des Proteins eine Veränderung des pH dahingehend beeinflusst, dass eine bessere Wirksamkeit der chemotherapeutischen Substanzen erreicht werden kann. Dies sind natürlich reine Spekulationen und bedürfen einer genauen Überprüfung.

Auffallend war, dass die Fälle mit Methylierung in CA4, p16, SOCS1, RUNX3, IGF2, Neurog1 und auch die CIMP-positiven Fälle ohne Chemotherapie die vergleichsweise kürzesten Überlebenszeiten aufwiesen. Insgesamt konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen Fällen mit positivem und negativem Methylierungsstatus gefunden werden (siehe Tabellen 4-16 und 4-17).

Eigentlich sollte man davon ausgehen, dass die Tumorpatienten ohne Chemotherapie ein kürzeres Überleben aufzeigen. Wie oben bereits beschrieben, trifft dies in den in CA4 positiv methylierten Fällen auch zu. Erstaunlicherweise war jedoch in den negativ methylierten Fällen – wenn auch nicht signifikant – das mittlere Überleben und auch das progressfreie Intervall in Monaten ohne Chemotherapie etwas länger als bei den Fällen ohne Chemotherapie. Im Gesamtüberleben war der Unterschied sehr gering, was eventuell auf die Fallzahlen oder auch auf die Berechnung zurückzuführen ist und daher keiner weiteren Betrachtung bedarf (siehe Tabelle 4-16). Beim progressionsfreien Überleben ging das mittlere Überleben mit 92,7 Monaten ohne Chemotherapie vs. 69,93 Monate mit Chemotherapie jedoch rein zahlenmäßig weit auseinander (siehe Tabelle 4-15). Diese Zahlen verdeutlichen nochmals, dass in dieser Gruppe kein Vorteil bezüglich der Rezidivinzidenz durch die Chemotherapie erreicht werden konnte. Den Zahlen zufolge könnte man mutmaßen, dass dieser Gruppe durch die Chemotherapie geschadet wurde. Die Gründe hierfür sind jedoch unklar. Es muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass für die Unterschiede im mittleren Überleben in dieser Gruppe keine statistische Signifikanz ermittelt werden konnte, sondern es sich lediglich um einen Trend handelt.

Im Gegensatz zu CA4 hatte sich bei den in dieser Arbeit analysierten CIMP-Markern kein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen Fällen mit und ohne Chemotherapie gezeigt, wenn man eine Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten Fällen in den konkreten Markern trifft. Dies trifft

auch auf den CIMP-Status zu, ausgehend von einem positiven CIMP-Status bei mehr als drei positiven CIMP-Markern (siehe Tabelle 4-17). Im Durchschnitt überlebten die Patienten jedoch 25,61 Monate länger bei positivem Methylierungsstatus (p16, SOCS 1, RUNX3, IGF2 oder Neurog1), wenn sie eine Chemotherapie erhalten hatten. Im Gegensatz hierzu überlebten die Patienten mit negativem Methylierungsstatus in p16, SOCS1, RUNX3 und IGF2 im Schnitt nur 5,7 Monate länger. Bei negativem Methylierungsstatus in Neurog1 verkürzte sich das Überleben sogar um 6,61 Monate, wenn diese Patienten eine Chemotherapie erhalten hatten (ähnlich wie bei CA4). Betrachtet man nun den CIMP-Status, so konnte durch eine Chemotherapie bei den CIMP-positiven Fällen eine Verlängerung des mittleren Überlebens um 16,45 Monate erreicht werden, während bei den CIMP-negativen Fällen die Patienten nur 7,55 Monate länger überlebten. Es hat sich hier keine statistische Signifikanz gezeigt. Der Trend, dass die Fälle mit positiver Methylierung in den hier analysierten CIMP-Markern von einer Chemotherapie mehr profitierten, als die Fälle mit negativer Methylierung, ist deutlich ersichtlich. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit anderen Studien. So wurde bei CIMP-positiven Fällen ein gutes Ansprechen auf eine Therapie mit 5-FU/Leucovorin-haltigen Chemotherapeutika gezeigt (63,140). Andere Studien hingegen zeigten, dass ein positiver CIMP-Status eher ein schlechtes Ansprechen auf eine Chemotherapie vorhersagen würde (9,106). Es gibt vergleichsweise wenig Studien, welche sich auf den CIMP-Status und das Ansprechen auf eine Chemotherapie beziehen. Im Gegensatz hierzu gibt es sehr viele Studien, welche den Mikrosatellitenstatus in Hinblick auf die Effektivität einer Chemotherapie analysieren. Auch hier hatten sich kontroverse Ergebnisse gezeigt (86,98). Hypermethylierung des hMLH1-Promotors liegt vielen Fällen von MSI zugrunde (71). Auch in dieser Arbeit wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Methylierung von CA4 und MSI gefunden. Daher ist anzumerken, dass CIMP und Mikrosatelliteninstabilität keine völlig unabhängigen Vorgänge sind. Interessant ist es daher, dass kontroverse Ergebnisse bezüglich der Effektivität einer Chemotherapie bei CIMP-positiven Tumoren auch unabhängig vom Mikrosatellitenstatus gefunden wurden. Bei van Rijnsoever wurde ein gutes Ansprechen auf Chemotherapie bei positivem CIMP-Status unabhängig vom Mikrosatellitenstatus beschrieben (140), während Ogino über ein schlechtes Ansprechen bei CIMP-positiven und MSS-Tumoren berichtete (106).

Wenn man nun die biochemischen Grundlagen betrachtet, müsste man davon ausgehen, dass ein positiver CIMP-Status die Effektivität einer Chemotherapie eher begünstigen sollte. Es wurde gezeigt, dass CIMP-positive Tumoren eine verminderte Expression von  $\gamma$ -Glutamyl-Hydrolase (GGH) aufzeigen. Durch mehrere Zwischenschritte vermindert die GGH indirekt die zelluläre Folsäurekonzentration. Die Reduktion der GGH bewirkt also erhöhte Folsäurekonzentrationen (72). Folsäure wird für die Wirkung von 5FU benötigt und erhöhte Konzentrationen von Folsäure verstärken die Wirkung von 5FU. Aus diesem Grund wird in den meisten Therapieregimen Folsäure zusammen mit 5FU verabreicht (122). Die genauen Abläufe sind jedoch noch nicht geklärt. Es müssen weitere Studien durchgeführt werden, um den genauen Mechanismus ausfindig zu machen. Wenn die biochemischen Grundlagen verstanden sind, kann eventuell auch die Wirkung einer Therapie mit 5FU vorhergesagt werden. Aktuell kann man sich nur an Studien orientieren, welche leider zu gegensätzlichen Aussagen kommen. Legt man die Ergebnisse dieser Arbeit zu Grunde, hatten die Fälle mit positivem CIMP-Status - dem biochemischen Modell entsprechend – tendenziell (nicht signifikant) mehr von einer Chemotherapie profitiert, als Fälle mit negativem CIMP-Status. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien sind sicherlich auch dadurch bedingt, dass es keinen einheitlichen Standard zur Identifizierung von CIMP gibt und auch viele weitere unbeantworteten Fragen bezüglich der Entstehung und Auswirkungen von CIMP bestehen. Daher ist es essenziell wichtig, ein standardisiertes Vorgehen zur Bestimmung von CIMP zu etablieren, um später therapeutische Konsequenzen ableiten zu können.

## 6 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wurde retrospektiv ein Profil bezüglich der Ausprägung verschiedener histologischer und klinischer Merkmale des KRK in einem Kollektiv, dessen Gewebeproben am Institut für Pathologie der Universität Regensburg von 1993 bis 2004 archiviert wurden, erarbeitet. Auswahlkriterium war das ausreichende Vorhandensein von Gewebe für spätere molekulare Untersuchungen.

Im Vergleich zu Angaben in der Literatur, hatten sich in diesem Kollektiv prozentual mehr Tumore im Zäkum und etwas weniger Tumore im Sigma und Rektum gezeigt. Das Auftreten von synchronen Zweit- und Drittkarzinomen lag mit 7,4% minimal über dem in der Literatur angegebenen Wert von 4% (11). Hauptsächlich befanden sich die Patienten bei Erstdiagnose im UICC-Stadium 3. Damit lag bei den meisten Patienten ein fortgeschrittenes Tumorstadium vor. Diese Beobachtung deckt sich mit Daten aus dem Tumorregister München (138). Histologisch wurden überwiegend Adenokarzinome mit mäßiger oder schlechter Differenzierung diagnostiziert. Das vorherrschende Tumorstadium war pT3. Auch diese Angaben korrelierten mit der Literatur bzw. den Daten aus dem Tumorregister München (52,138). Im Nodalstatus hingegen zeigten sich im Vergleich zum Tumorregister München im Kollektiv häufiger fortgeschrittene Stadien (138). Die erhobenen prä- und posttherapeutischen CEA-Werte stellten gute Verlaufsparemeter dar, aber aufgrund mangelnder Sensitivität und Spezifität sollte sich eine Therapieentscheidung nicht alleine auf eine Erhöhung des CEA-Wertes stützen (38).

Obwohl insgesamt bei Erstdiagnose ein fortgeschrittenes Stadium vorlag, blieben 70% der Patienten rezidivfrei. Im Kollektiv hatten sich also vergleichbare Rezidivraten wie in verschiedenen Studien gezeigt; Metaanalyse in (36). Die häufigsten Rezidive wurden in Form von Fernmetastasen – genauer Lebermetastasen – verzeichnet. Interessanterweise trat bei allen Patienten im UICC-Stadium 1 im Beobachtungszeitraum kein Rezidiv auf, wodurch man von einer Heilung ausgehen kann. Zu bemerken ist, dass sich ein signifikanter Unterschied im mittleren Überleben zeigte, wenn man die Fälle bezüglich des ECOG (109) betrachtet, aber kein Unterschied im mittleren Überleben zwischen den ASA-Stadien (112) vorliegt. Obwohl beide Klassifizierungen eine direkte

oder indirekte Aussage über den Allgemeinzustand des Patienten treffen, ergeben sich unterschiedliche Resultate im mittleren Überleben. Fraglich ist, weshalb in den Fällen mit low-grade und high-grade Tumoren kein Unterschied in der Rezidivrate oder auch im mittleren Überleben auftrat, obwohl high-grade Tumore laut Literatur mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (23). Insgesamt zeigten sich im nationalen und internationalen Vergleich in den UICC-Stadien 1-3 vergleichbare Überlebensraten. Im UICC-Stadium 4 zeigte sich im Ausgangskollektiv sogar eine bessere Überlebensrate (59,97,117,138).

In etwas über der Hälfte der Fälle wurde eine adjuvante Therapie durchgeführt. Es wurden jedoch nur 68% der Patienten im UICC-Stadium 3 einer adjuvanten Therapie zugeführt. Die Patienten im UICC-Stadium 3, welche eine Chemotherapie erhalten hatten, lebten signifikant länger, als die Patienten ohne adjuvante Therapie. Diese Daten untermauern die Empfehlung der aktuell geltenden Leitlinien, dass ab UICC-Stadium 3 eine Chemotherapie durchgeführt werden sollte (126).

Zusammenfassend konnte in der hier vorliegenden Studie nicht nur eine Aussage über histologische und klinische Merkmale der kolorektalen Karzinome in einem bestimmten Kollektiv getroffen werden, sondern es konnte auch eine große Subgruppe innerhalb dieses Kollektivs identifiziert werden, welche – definiert durch das UICC-Stadium 3 – eine homogene Struktur für weitere Analysen bietet. Zu berücksichtigen sind jedoch die Limitationen des retrospektiven Studiendesigns. An dieser Subgruppe (ergänzt durch weitere Fälle im UICC-Stadium 3) wurde die Methylierungsanalyse von CA4 im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführt.

Ziel der Methylierungsanalyse von CA4 war es, einen prädiktiven Marker zur prätherapeutischen Evaluation einer Chemotherapie zu identifizieren. Hierzu wurde die Promotormethylierung von CA4 in einem homogenen Kollektiv mit KRK im UICC-Stadium 3 mittels QESD (14) untersucht. Es hatte sich eine nahezu homogene Verteilung von methylierten und unmethylierten Promotoren von CA4 gezeigt. Problematisch ist jedoch, dass es weder bei der QESD, noch bei anderen Methoden zur Analysierung des Methylierungsstatus, ein standardisiertes Vorgehen zur Festlegung der Cut-off Werte für einen positiven Status gibt. Die Cut-off Werte bei CA4 und auch den CIMP-Markern waren empirische Werte,

welche sich an den vorliegenden Daten orientierten. Es ist also möglich, dass sich falsch positive oder falsch negative Werte in der Auswertung befinden.

Die Frage nach epigenetischen Markern hängt direkt mit dem CIMP-Status zusammen. CIMP definiert sich durch eine Hypermethylierung von CpG-Inseln (136). Bisher gibt es keinen Konsensus in der Frage, welche Marker zur Bestimmung des CIMP-Status herangezogen werden sollten. Diverse Panels wurden vorgeschlagen. Diese Arbeit orientiert sich an den von Weisenberger et al. vorgeschlagenen Markern CACNA1G, IGF2, Neurog1, RUNX3 und SOCS1, wobei CACNA1G gegen p16 ersetzt wurde (145). In den untersuchten CIMP-Markern hatten sich beinahe exakt die gleichen Methylierungshäufigkeiten der einzelnen Marker gezeigt wie in groß angelegten Studien von Ogino und Barault (10,104). Somit hatten sich unter den gewählten Cut-off Werten realistische Werte abgezeichnet.

Ähnlich wie in der Festlegung der Marker selbst, gibt es auch unterschiedliche Ansichten, ab welcher Anzahl an positiven Markern ein positiver CIMP-Status vorliegt und welche Subtypen sich dahinter verbergen (No-CIMP, CIMP-low, CIMP-high und eventuell auch intermediate-CIMP) (47,104,146). Wie bei Weisenberger wurde hier ein positiver CIMP-Status ab 3 positiven Markern festgelegt (145).

In der Literatur ist ein positiver CIMP-Status mit höherem Alter (>70 Jahre), schlechterer Differenzierung (G3), höherem Tumorstadium (UICC-Stadium III), MSI-H, KRAS-Mutation (CIMP-low) und BRAF-Mutationen (CIMP-high) assoziiert und ist invers korreliert mit CIN und p53-Status (4,8,45,69,73,100,125,141); und Übersicht in (47). Bezüglich der Effektivität einer Chemotherapie in Abhängigkeit vom CIMP-Status liegen in der Literatur kontroverse Ergebnisse vor (9,63,106,140). In dieser Arbeit hatte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Überleben allgemein und in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe ergeben. Tendenziell hatten die Patienten mit positivem Methylierungsstatus in den einzelnen Markern und auch mit positivem CIMP-Status mehr von einer Chemotherapie profitiert, als die Fälle mit negativem Methylierungsstatus.

Die Korrelation des Methylierungsstatus von CA4 mit Grading, MSI und p53-Status ergab ein ähnliches Profil wie bei positivem CIMP-Status. Keine

Korrelation hatte sich bezüglich des Alters und des histologischen Tumorstadiums gezeigt. Hierdurch könnte vermutet werden, dass die Promotormethylierung von CA4 ein relativ frühes Ereignis in der Tumorentstehung ist. Bei der Betrachtung von CIN lag eine homologe Verteilung von positiven und negativen Fällen vor, sodass keine inverse Korrelation wie beim CIMP-Status abgeleitet werden konnte. Bei BRAF hatte sich ein deutlicher Trend ohne statistische Signifikanz gezeigt. Bei sehr geringer Fallzahl von BRAF-Mutationen im Kollektiv wies der Großteil der mutierten Fälle eine Promotormethylierung in CA4 auf. Bei KRAS lag tendenziell – jedoch ebenfalls ohne Signifikanz – eher der Wildtyp vor. Berücksichtigt man die Trends, so verhalten sich die Fälle mit positiver Methylierung in CA4 ähnlich der CIMP-high-Fälle, wie sie in der Übersichtsarbeit von Grady dargestellt sind (47). Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass eine Methylierung in CA4 eine weitere Eigenschaft der CIMP-high-Tumoren darstellt oder auch, dass CA4 ein eigenständiger, sensitiver Marker für CIMP-high-Tumoren ist. Festzuhalten ist jedenfalls eine Ähnlichkeit im Verhalten von Tumoren mit Methylierung in CA4 und CIMP-positiven Tumoren. In der Korrelationsanalyse des Methylierungsstatus von CA4 und den CIMP-Markern hatte sich eine statistisch signifikante Assoziation gezeigt. Die CIMP-Marker waren beinahe ausschließlich in Fällen methyliert, in denen auch der Promotor von CA4 methyliert war. Umgekehrt lag in ca. einem Drittel der Fälle eine Methylierung des Promotors von CA4 vor, aber kein einziger der CIMP-Marker war methyliert. Dies lässt auf einen zusätzlichen Weg schließen, wodurch die Methylierung von CA4 angestoßen wird.

Das interessanteste Ergebnis dieser Arbeit lag jedoch in der Betrachtung des Gesamtüberlebens bzw. progressfreien Überlebens in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe und Methylierungsstatus. So hatten sich keine Unterschiede im mittleren und progressfreien Überleben bei Fällen mit positivem oder negativem Methylierungsstatus gezeigt, aber wenn man eine Unterteilung in Fälle mit und ohne adjuvante Chemotherapie trifft, ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Verlauf. Die Patienten mit Tumoren mit positivem Methylierungsstatus von CA4 lebten mit Chemotherapie signifikant länger und waren auch signifikant länger rezidivfrei, als Fälle mit positivem Methylierungsstatus ohne adjuvante Therapie. Bei den methylierungsnegativen Fällen hingegen ergab sich kein Unterschied im Verlauf bei Patienten mit und



ohne adjuvanter Therapie. Die positiv methylierten Fälle profitierten also signifikant von einer Chemotherapie, während Patienten mit negativ methylierten Tumoren sich einer nebenwirkungsreichen Chemotherapie unterzogen hatten, ohne dass hierdurch ein Überlebensvorteil für sie erreicht werden konnte. Welchen Einfluss die Stilllegung des CA4-Gens auf die Verstoffwechslung von Chemotherapeutika haben könnte, ist unklar und muss gesondert erforscht werden. Zusammengefasst kann die prätherapeutische Methylierungsanalyse von CA4 anhand der hier erstellten Daten zur Therapieentscheidung beitragen. Eine Verifizierung dieser Daten sollte nun durch eine prospektive, randomisierte und multizentrische Studie erfolgen.

## Abkürzungsverzeichnis

KRK: Kolorektales Karzinom

HNPCC: Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom

FAP: Familiäre adenomatöse Polyposis

RKI: Robert-Koch-Institut

MSI: Mikrosatelliteninstabilität

MSI-h: hochgradige Mikrosatelliteninstabilität

CIN: Chromosomale Instabilität

LOH: Loss of heterozygosity

CIMP: CpG island methylator phenotype

MINT: methylated-in-tumor

DNA: Desoxyribonukleinsäure/acid

C: Cytosin

G: Guanin

A: Adenin

T: Thymin

APC: Adenomatous-polyposis-coli

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

DCC: Deleted in colorectal cancer

EGF : Epidermal-Growth-Faktor

DNMT: DNA-Methyltransferase

LSD1: Lysinspezifische Demethylase

HP1: Heterochromatines Protein

H: Histon

MBP: Methyl-CpG-bindendes-Protein

HDAC: Histondeacetylase

RB1: Retinoblastom 1

VHL: von-Hippel-Lindau

INK4a: Inhibitor-of-cyclin-dependent kinase 4

E-CAD: Epitheliales-Cadherin

MLH1: mutL homolog 1

IL: Interleukin

CSF: koloniestimulierender Faktor

INF: Interferone

EPO: Erythropoetin

CACNA1G: voltage-dependent calcium channel alpha 1G subunit

IGF2: Insulin-like growth factor 2

Neurog1: Neurogenin 1

CDKN2A (p16): Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CRABP1: Cellular retinoic acid binding protein 1

LOX: Lysyl oxidase

SLC30A10: solute carrier familiy 30, member 10

ELMO1: Engulfment and cell motility 1

FBN2: fibrillin 2

THBD: Thrombomodulin

HAND1: heart and neural crest derivatives expressed 1

CA4: Carboanhydrase 4 (Gen)

CAIV: Carboanhydrase IV (Protein)

SOCS1: Suppressor of cytokine signaling 1

RUNX3: Runt-related transcription factor 3

GGH:  $\gamma$ -Glutamyl-Hydrolase

CO<sub>2</sub>: Kohlenstoffdioxid

HPLC: high-performance liquid chromatographiy

LC-PCR: Light cycler-Polymerase chain reaction

PCR-SSCP: Polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism

QESD: Quantifizierung Endonuklease-resistenter DNA

Abb: Abbildung

Quant: Quantifizierungsansatz

Kal: Kalibratoransatz

CP: Crossing Point

PMR: Percentage of methylated reference

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

ASA: American Society of Anesthesiologists

CEA: Carcino embryonales Antigen

LJ: Lebensjahr

KOF: Körperoberfläche

UICC: Union International Contre le Cancer

T : Tumor

N : Nodal

M: Metastasen

G: Grading

L: Lymphstatus

V: Gefäßstatus

FOLFOX: Folsäure 5-Fluorouracil Oxaliplatin

5-FU : 5-Fluorouracil

GGH:  $\gamma$ -Glutamyl-Hydrolase

SEER: Surveillance Epidemiology and End Results

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersverteilung von Darmkrebs in Deutschland (120) .....	4
Abbildung 2: Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2006 (120) .....	5
Abbildung 3: Krebssterbefälle in Deutschland 2006 (120).....	5
Abbildung 4: Molekulares Progressionsmodell im KRK (131).....	9
Abbildung 5: Paralleles Progressionsmodell im KRK (66) .....	9
Abbildung 6: Molekulare Mechanismen der Methylierung (53) .....	15
Abbildung 7: Carboanhydrasen katalysieren die CO <sub>2</sub> -Hydratisierung (13) .....	19
Abbildung 8: Carboanhydrase IV mit Glycosylphosphatidyl-inositol-Anker (134) .....	20
Abbildung 9: Darstellung des methylierungs-sensitiven Verdaus mit Hin6I .....	27
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Ablaufes der PCR des Quantifizierungsansatzes .....	28
Abbildung 11: Beispiel Real-time-quantitative-PCR zur Methylierungsanalyse .	31
Abbildung 12: Schmelzkurve zur Real-time-quantitative-PCR aus Abb. 11 .....	32
Abbildung 13: Ct- und Methylierungswerte zur real-time PCR in Abbildung 11 (CP=Crossing Point, Quant=Quantifizierungsansatz, Kal=Kalibratoransatz, Blut=Negativkontrolle, SW48=Positivkontrolle) .....	33
Abbildung 14: Allgemeiner Leistungszustand der Patienten nach ECOG zu Beginn der Behandlung .....	34
Abbildung 15: Tumorstatus zu Beginn der Behandlung.....	35
Abbildung 16: Behandlungsintention zu Beginn der Behandlung.....	35
Abbildung 17: Primärtumorlokalisation in absoluten Zahlen.....	36
Abbildung 18: Verteilung von KRK im Darm a) in der Bevölkerung (127) und b) im Ausgangskollektiv .....	36
Abbildung 19: ASA-Score im Ausgangskollektiv .....	37
Abbildung 20: Art der Operationen in absoluten Zahlen.....	39
Abbildung 21: Verteilung der klinischen R-Klassifikation .....	41
Abbildung 22: Verteilung Tumorentitäten.....	43
Abbildung 23: Verteilung Grading .....	43
Abbildung 24: Verteilung der Tumorstadien .....	44
Abbildung 25: Verteilung Nodalstatus .....	44

Abbildung 26: Verteilung UICC-Stadien .....	45
Abbildung 27: Anzahl der Fälle mit neoadjuvanter Radiochemotherapie, adjuvanter Chemotherapie, adjuvanter Radiotherapie und adjuvanter Radiochemotherapie .....	48
Abbildung 28: Verteilung der prätherapeutischen CEA-Werte auf die UICC- Stadien .....	50
Abbildung 29: Boxplot zum Verlauf der CEA-Werte vor und nach Therapie .....	51
Abbildung 30: Ausschnitt aus Abbildung 29; Verlauf CEA-Werte .....	52
Abbildung 31: Rezidivverteilung .....	52
Abbildung 32: Tumorstatus zum Zeitpunkt des Rezidiv .....	53
Abbildung 33: Metastasenlokalisation bei Rezidiv .....	53
Abbildung 34: Rezidivfreies Überleben in UICC-Stadium 1-4 .....	54
Abbildung 35: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von Grading .....	55
Abbildung 36: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit der R-Klassifizierung .....	56
Abbildung 37: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der Lymphgefäßinfiltration .....	57
Abbildung 38: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der Blutgefäßinfiltration .....	58
Abbildung 39: Survival-Status .....	59
Abbildung 40: Todesursachen .....	60
Abbildung 41: Overall Survival in Abhängigkeit vom UICC-Stadium .....	61
Abbildung 42: Overall Survival in Abhängigkeit des Gratings .....	62
Abbildung 43: Overall Survival in Abhängigkeit vom Rezidivstatus .....	63
Abbildung 44: Overall Survival in Abhängigkeit von der Anzahl der Behandlungsabschnitte .....	64
Abbildung 45: Overall Survival in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe .....	65
Abbildung 46: OS bei Patienten im UICC-Stadium 3 mit und ohne Chemotherapie .....	66
Abbildung 47: Overall Survival in Abhängigkeit vom ASA-Score .....	67
Abbildung 48: Overall Survival in Abhängigkeit von der ECOG- Klassifizierung .....	68
Abbildung 49: Overall Survival in Abhängigkeit von der Therapieintention .....	69
Abbildung 50: Verteilung der Methylierung von CA4 in Prozent als Boxplot ....	70
Abbildung 51: Korrelation von CA4-Methylierungsstatus und Grading .....	72

Abbildung 52: Verteilung von CA4- und CIMP-Marker-Methylierung in Prozent.....	75
Abbildung 53: Prozentuale Verteilung bei positivem Methylierungsstatus als Boxplot .....	76
Abbildung 54: Häufigkeitsverteilung der Methylierung der CIMP-Marker.....	76
Abbildung 55: Gleichzeitige Methylierung von CA4 und CIMP-Markern.....	78
Abbildung 56: Synchrone Methylierung aller CIMP-Marker und CA4 .....	79
Abbildung 57: Progressionsfreies Überleben bei Patienten mit positivem und negativem Methylierungsstatus.....	80
Abbildung 58: Progressionsfreies Überleben bei positivem Methylierungsstatus von CA4 in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe .....	82
Abbildung 59: Progressionsfreies Überleben bei negativem Methylierungsstatus von CA4 in Abhängigkeit von der Gabe von Chemotherapie.....	82
Abbildung 60: Gesamtüberleben von Patienten mit positivem und negativem Methylierungsstatus.....	83
Abbildung 61: Überlebenskurve bei positivem Methylierungsstatus von CA4 in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe .....	85
Abbildung 62: Überlebenskurve bei negativem Methylierungsstatus von CA4 in Abhängigkeit von Chemotherapiegabe .....	85
Abbildung 63: Gesamtüberleben der CIMP-positiven und –negativen Fälle .....	86
Abbildung 64: Gesamtüberleben der CIMP-positiven Fälle in Abhängigkeit von Chemotherapie.....	87
Abbildung 65: Gesamtüberleben der CIMP-negativen Fälle in Abhängigkeit von Chemotherapie.....	87

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Amsterdam II-Kriterien und überarbeitete Bethesda-Kriterien (140,143,144) .....	7
Tabelle 1-2: Stadieneinteilung des KRK nach UICC und Dukes (2,28).....	10
Tabelle 3-1: Primerpaare zur Analyse von CA4, p16, SOCS1 und RUNX3 mit Annealing-Temperatur .....	24
Tabelle 3-2: Verteilung von Geschlecht und Alter im Ausgangskollektiv .....	25
Tabelle 3-3: Alter, T-Stadium, Nodalstatus und Grading der Fälle im UICC- Stadium 3 .....	26
Tabelle 3-4: Ansätze für den Quantifizierungs- und Kalibratorverdau .....	29
Tabelle 4-1: Metastasen bei Primärdiagnose und Lokalisation .....	37
Tabelle 4-2: Operationsintention.....	38
Tabelle 4-3: Durchgeführte Operationen .....	40
Tabelle 4-4: Häufigkeitsverteilung der Art der Operation mit jeweiligem Zugang .....	42
Tabelle 4-5: Auflistung der Tumorkonfiguration und des L- und V-Status .....	46
Tabelle 4-6: Auflistung der verabreichten Chemotherapeutika .....	48
Tabelle 4-7: Verteilung der chemotherapeutischen Behandlung auf die UICC- Stadien .....	49
Tabelle 4-8: Verteilung der prätherapeutischen CEA-Werte auf die UICC- Stadien .....	50
Tabelle 4-9: Alter, Tumorstadium und Grading in Korrelation zum Methylierungsstatus von CA4 .....	71
Tabelle 4-10: MSI-Status, CIN, KRAS- und BRAF-Mutation in Korrelation zum Methylierungsstatus von CA4 .....	73
Tabelle 4-11: p53-Verlust in Korrelation zum Methylierungsstatus von CA4.....	74
Tabelle 4-12: Korrelation Methylierungsstatus CIMP-Marker und CA4 .....	77
Tabelle 4-13: Methylierung von CA4 und CIMP-Markern .....	78
Tabelle 4-14: Kreuztabelle zur CA4- und CIMP-Marker-Methylierung .....	79
Tabelle 4-15: Progressionsfreies Überleben in Monaten in Abhängigkeit von Methylierungsstatus und Gabe von Chemotherapie .....	81
Tabelle 4-16: Mittleres Gesamtüberleben in Monaten in Abhängigkeit von CA4-Methylierungsstatus und Gabe von Chemotherapie .....	84



---

Tabelle 4-17: Mittleres Gesamtüberleben in Monaten in Abhängigkeit von CIMP-Methylierungsstatus und Gabe von Chemotherapie.....	88
Tabelle 4-18: Mittleres Gesamtüberleben in Monaten in Abhängigkeit von CIMP-Status und Methylierung von CA4.....	89

## Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch - Institut. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. 2004. Saarbrücken.  
Ref Type: Report
2. **TNM Classification of Malignant Tumours.** Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., and Wittekind, Ch. 7th Edition. 2009. Oxford, Wiley-Blackwell.  
Ref Type: Report
3. **Ahlquist, T., G. E. Lind, V. L. Costa, G. I. Meling, M. Vatn, G. S. Hoff, T. O. Rognum, R. I. Skotheim, E. Thiis-Evensen, and R. A. Lothe.** 2008. Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers. *Mol. Cancer* **7**:94.
4. **Ahuja, N., Q. Li, A. L. Mohan, S. B. Baylin, and J. P. Issa.** 1998. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res.* **58**:5489-5494.
5. **Alexander, W. S. and D. J. Hilton.** 2004. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **22**:503-529.
6. **Allen, W. L., V. M. Coyle, and P. G. Johnston.** 2006. Predicting the outcome of chemotherapy for colorectal cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**:332-336.
7. **American Gastroenterological Association.** 2000. American Gastroenterological Association medical position statement: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *American College of Gastroenterology. Gastroenterology* **118**:1233-1234.
8. **Ang, P. W., W. Q. Li, R. Soong, and B. Iacopetta.** 2009. BRAF mutation is associated with the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer from young patients. *Cancer Lett.* **273**:221-224.
9. **Arnold, C. N., A. Goel, and C. R. Boland.** 2003. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* **106**:66-73.
10. **Barault, L., C. Charon-Barra, V. Jooste, I. de, V, L. Martin, P. Roignot, P. Rat, A. M. Bouvier, P. Laurent-Puig, J. Faivre, C. Chapusot, and F. Piard.** 2008. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. *Cancer Res.* **68**:8541-8546.

11. **Barillari, P., G. Ramacciato, A. R. De, P. Gozzo, M. Indinnimeo, S. Valabrega, P. Aurello, and G. Fegiz.** 1990. Effect of preoperative colonoscopy on the incidence of synchronous and metachronous neoplasms. *Acta Chir Scand.* **156**:163-166.
12. **Bazan, V., M. Migliavacca, C. Tubiolo, M. Macaluso, I. Zanna, S. Corsale, A. Amato, V. Calo, G. Dardanoni, V. Morello, F. M. La, I. Albanese, R. M. Tomasino, N. Gebbia, and A. Russo.** 2002. Have p53 gene mutations and protein expression a different biological significance in colorectal cancer? *J. Cell Physiol* **191**:237-246.
13. **Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer.** 2003. *Biochemie*, p. 263. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
14. **Bettstetter, M., S. Dechant, P. Ruemmele, C. Vogel, K. Kurz, M. Morak, G. Keller, E. Holinski-Feder, F. Hofstaedter, and W. Dietmaier.** 2008. MethyQESD, a robust and fast method for quantitative methylation analyses in HNPCC diagnostics using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples. *Lab Invest* **88**:1367-1375.
15. **Bird, A. P.** 1980. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**:1499-1504.
16. **Bird, A. P. and A. P. Wolffe.** 1999. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**:451-454.
17. **Brenner, H., L. Altenhofen, and M. Hoffmeister.** 2010. Zwischenbilanz der Früherkennungskoloskopie nach acht Jahren: Eine Hochrechnung und erste Ergebnisse. *Dtsch Arztebl Int* **107(43)**:753-9.
18. **Breton, S.** 2001. The cellular physiology of carbonic anhydrases. *JOP.* **2**:159-164.
19. **Carter, N. D., A. Fryer, A. G. Grant, R. Hume, R. G. Strange, and P. J. Wistrand.** 1990. Membrane specific carbonic anhydrase (CAIV) expression in human tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **1026**:113-116.
20. **Chapman, M. A., D. Buckley, D. B. Henson, and N. C. Armitage.** 1998. Preoperative carcinoembryonic antigen is related to tumour stage and long-term survival in colorectal cancer. *Br. J Cancer* **78**:1346-1349.
21. **Chen, W., N. Gao, Y. Shen, and J. N. Cen.** 2010. Hypermethylation downregulates Runx3 gene expression and its restoration suppresses gastric epithelial cell growth by inducing p27 and caspase3 in human gastric cancer. *J. Gastroenterol Hepatol.* **25**:823-831.
22. **Cheng, Y. W., H. Pincas, M. D. Bacolod, G. Schemmann, S. F. Giardina, J. Huang, S. Barral, K. Idrees, S. A. Khan, Z. Zeng, S. Rosenberg, D. A. Notterman, J. Ott, P. Paty, and F. Barany.** 2008. CpG island methylator phenotype associates with low-degree chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**:6005-6013.

23. **Compton, C. C.** 1999. Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? *Dig. Dis.* **17**:67-79.
24. **Curtin, K., M. L. Slattery, R. Holubkov, S. Edwards, J. A. Holden, and W. S. Samowitz.** 2004. p53 alterations in colon tumors: a comparison of SSCP/sequencing and immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **12**:380-386.
25. **Deplus, R., C. Brenner, W. A. Burgers, P. Putmans, T. Kouzarides, L. Y. de, and F. Fuks.** 2002. Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res.* **30**:3831-3838.
26. **Dietmaier, W., M. Bettstetter, P. J. Wild, M. Woenckhaus, P. Rummele, A. Hartmann, S. Dechant, H. Blaszyk, A. Pauer, M. Klinkhammer-Schalke, and F. Hofstadter.** 2006. Nuclear Masp expression is associated with response to adjuvant 5-fluorouracil based chemotherapy in patients with stage III colon cancer. *Int J. Cancer* **118**:2247-2254.
27. **Dietmaier, W., S. Wallinger, T. Bocker, F. Kullmann, R. Fishel, and J. Ruschoff.** 1997. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res.* **57**:4749-4756.
28. **Dukes, C. E.** 1944. The Surgical Pathology of Rectal Cancer: President's Address. *Proc. R. Soc. Med.* **37**:131-144.
29. **Eads, C. A., R. V. Lord, S. K. Kurumboor, K. Wickramasinghe, M. L. Skinner, T. I. Long, J. H. Peters, T. R. DeMeester, K. D. Danenberg, P. V. Danenberg, P. W. Laird, and K. A. Skinner.** 2000. Fields of aberrant CpG island hypermethylation in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Cancer Res.* **60**:5021-5026.
30. **Eads, C. A., R. V. Lord, K. Wickramasinghe, T. I. Long, S. K. Kurumboor, L. Bernstein, J. H. Peters, S. R. DeMeester, T. R. DeMeester, K. A. Skinner, and P. W. Laird.** 2001. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res.* **61**:3410-3418.
31. **Edge, S. B., D. R. Byrd, C. C. Compton, A. G. Fritz, F. L. Greene, and A. Trotti.** 2010. *AJCC Cancer Staging Manual.* Springer, New York.
32. **Ekbom, A., C. Helmick, M. Zack, and H. O. Adami.** 1990. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* **336**:357-359.
33. **Ekbom, A., C. Helmick, M. Zack, and H. O. Adami.** 1990. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N. Engl. J. Med.* **323**:1228-1233.
34. **Eshleman, J. R., G. Casey, M. E. Kochera, W. D. Sedwick, S. E. Swinler, M. L. Veigl, J. K. Willson, S. Schwartz, and S. D. Markowitz.** 1998. Chromosome number and structure both are markedly stable in RER

- colorectal cancers and are not destabilized by mutation of p53. *Oncogene* **17**:719-725.
35. **Fearon, E. R. and B. Vogelstein.** 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**:759-767.
  36. **Figueredo, A., R. B. Rumble, J. Maroun, C. C. Earle, B. Cummings, R. McLeod, L. Zuraw, and C. Zwaal.** 2003. Follow-up of patients with curatively resected colorectal cancer: a practice guideline. *BMC. Cancer* **3**:26.
  37. **Fleming, R. E., S. Parkkila, A. K. Parkkila, H. Rajaniemi, A. Waheed, and W. S. Sly.** 1995. Carbonic anhydrase IV expression in rat and human gastrointestinal tract regional, cellular, and subcellular localization. *J. Clin. Invest* **96**:2907-2913.
  38. **Fletcher, R. H.** 1986. Carcinoembryonic antigen. *Ann. Intern. Med.* **104**:66-73.
  39. **Frazier, M. L., L. Xi, J. Zong, N. Viscofsky, A. Rashid, E. F. Wu, P. M. Lynch, C. I. Amos, and J. P. Issa.** 2003. Association of the CpG island methylator phenotype with family history of cancer in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* **63**:4805-4808.
  40. **Galandiuk, S., H. S. Wieand, C. G. Moertel, S. S. Cha, R. J. Fitzgibbons, Jr., J. H. Pemberton, and B. G. Wolff.** 1992. Patterns of recurrence after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Surg. Gynecol. Obstet.* **174**:27-32.
  41. **Gardiner-Garden, M. and M. Frommer.** 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol. Biol.* **196**:261-282.
  42. **Gertig, D. M. and D. J. Hunter.** 1998. Genes and environment in the etiology of colorectal cancer. *Semin. Cancer Biol.* **8**:285-298.
  43. **Giovannucci, E.** 2001. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **10**:725-731.
  44. **Giovannucci, E.** 2003. Diet, body weight, and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. *J Womens Health (Larchmt. )* **12**:173-182.
  45. **Goel, A., T. Nagasaka, C. N. Arnold, T. Inoue, C. Hamilton, D. Niedzwiecki, C. Compton, R. J. Mayer, R. Goldberg, M. M. Bertagnolli, and C. R. Boland.** 2007. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* **132**:127-138.
  46. **Gold, P. and S. O. Freedman.** 1965. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp. Med.* **122**:467-481.

47. **Grady, W. M.** 2007. CIMP and colon cancer gets more complicated. *Gut* **56**:1498-1500.
48. **Grady, W. M., J. Willis, P. J. Guilford, A. K. Dunbier, T. T. Toro, H. Lynch, G. Wiesner, K. Ferguson, C. Eng, J. G. Park, S. J. Kim, and S. Markowitz.** 2000. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat. Genet.* **26**:16-17.
49. **Greten, H.** 2005. Kolorektales Karzinom (KRK), p. 756-763. *Innere Medizin Verstehen - Lernen - Anwenden.* Thieme, Stuttgart.
50. **Grunau, C., S. J. Clark, and A. Rosenthal.** 2001. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* **29**:E65.
51. **Half, E., D. Bercovich, and P. Rozen.** 2009. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet. J Rare. Dis.* **4**:22.
52. Hamilton, R. S. and L. A. Aaltonen. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System, World Health Organization Classification of Tumours. 103-143. 2000.  
Ref Type: Report
53. **Handel, A. E., G. C. Ebers, and S. V. Ramagopalan.** 2009. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. *Trends Mol. Med.* **16**(1):7-16.
54. **Herman, J. G., J. R. Graff, S. Myohanen, B. D. Nelkin, and S. B. Baylin.** 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:9821-9826.
55. **Herman, J. G., F. Latif, Y. Weng, M. I. Lerman, B. Zbar, S. Liu, D. Samid, D. S. Duan, J. R. Gnarr, W. M. Linehan, and .** 1994. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**:9700-9704.
56. **Hermanek, P., U. Mansmann, D. S. Staimmer, S. Riedl, and P. Hermanek.** 2000. The German experience: the surgeon as a prognostic factor in colon and rectal cancer surgery. *Surg. Oncol Clin. N. Am.* **9**:33-49, vi.
57. HGNC. CA4 carbonic anhydrase IV [ *Homo sapiens* ] .  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&log\\$=seqview\\_gene&list\\_uids=762](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&log$=seqview_gene&list_uids=762) . 12-2-2010. 25-2-2010.  
Ref Type: Electronic Citation
58. **Hinoue, T., D. J. Weisenberger, F. Pan, M. Campan, M. Kim, J. Young, V. L. Whitehall, B. A. Leggett, and P. W. Laird.** 2009. Analysis of the association between CIMP and BRAF in colorectal cancer by DNA methylation profiling. *PLoS. One.* **4**:e8357.

59. Hohenberger, W. Tumorzentrum der Universität Erlangen-Nürnberg Qualitätsbericht 2009. [www.tumorzentrum.uk-erlangen.de/](http://www.tumorzentrum.uk-erlangen.de/) . 2009. 14-3-2012.  
Ref Type: Electronic Citation
60. **Hughes, L. A., C. A. Khalid-de Bakker, K. M. Smits, P. A. van den Brandt, D. Jonkers, N. Ahuja, J. G. Herman, M. P. Weijenberg, and E. M. van.** 2012. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: Progress and problems. *Biochim. Biophys. Acta* **1825**:77-85.
61. **Husmann, D. A. and H. M. Spence.** 1990. Current status of tumor of the bowel following ureterosigmoidostomy: a review. *J Urol.* **144**:607-610.
62. **Iacopetta, B., F. Grieu, W. Li, A. Ruszkiewicz, M. Caruso, J. Moore, G. Watanabe, and K. Kawakami.** 2006. APC gene methylation is inversely correlated with features of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **119**:2272-2278.
63. **Iacopetta, B., K. Kawakami, and T. Watanabe.** 2008. Predicting clinical outcome of 5-fluorouracil-based chemotherapy for colon cancer patients: is the CpG island methylator phenotype the 5-fluorouracil-responsive subgroup? *Int. J. Clin. Oncol.* **13**:498-503.
64. **Innocenti, A., M. A. Firnges, J. Antel, M. Wurl, A. Scozzafava, and C. T. Supuran.** 2004. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the membrane-bound human isozyme IV with anions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**:5769-5773.
65. **Issa, J. P.** 2004. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**:988-993.
66. **Issa, J. P.** 2008. Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clin. Cancer Res.* **14**:5939-5940.
67. **Issa, J. P., N. Ahuja, M. Toyota, M. P. Bronner, and T. A. Brentnall.** 2001. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res.* **61**:3573-3577.
68. **Issa, J. P., L. Shen, and M. Toyota.** 2005. CIMP, at last. *Gastroenterology* **129**:1121-1124.
69. **Kakar, S., G. Deng, L. Cun, V. Sahai, and Y. S. Kim.** 2008. CpG island methylation is frequently present in tubulovillous and villous adenomas and correlates with size, site, and villous component. *Hum. Pathol.* **39**:30-36.
70. **Kamb, A., N. A. Gruis, J. Weaver-Feldhaus, Q. Liu, K. Harshman, S. V. Tavtigian, E. Stockert, R. S. Day, III, B. E. Johnson, and M. H. Skolnick.** 1994. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* **264**:436-440.
71. **Kane, M. F., M. Loda, G. M. Gaida, J. Lipman, R. Mishra, H. Goldman, J. M. Jessup, and R. Kolodner.** 1997. Methylation of the

- hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* **57**:808-811.
72. **Kawakami, K., A. Ooyama, A. Ruszkiewicz, M. Jin, G. Watanabe, J. Moore, T. Oka, B. Iacopetta, and T. Minamoto.** 2008. Low expression of gamma-glutamyl hydrolase mRNA in primary colorectal cancer with the CpG island methylator phenotype. *Br. J. Cancer* **98**:1555-1561.
  73. **Kim, J. C., J. S. Choi, S. A. Roh, D. H. Cho, T. W. Kim, and Y. S. Kim.** 2010. Promoter Methylation of Specific Genes is Associated with the Phenotype and Progression of Colorectal Adenocarcinomas. *Ann. Surg. Oncol.* **17**(7):1767-76.
  74. **Kivela, A. J., J. Kivela, J. Saarnio, and S. Parkkila.** 2005. Carbonic anhydrases in normal gastrointestinal tract and gastrointestinal tumours. *World J. Gastroenterol.* **11**:155-163.
  75. **Kramer, J. A., M. D. Adams, G. B. Singh, N. A. Doggett, and S. A. Krawetz.** 1998. A matrix associated region localizes the human SOCS-1 gene to chromosome 16p13.13. *Somat. Cell Mol. Genet.* **24**:131-133.
  76. **Krebs, D. L. and D. J. Hilton.** 2001. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* **19**:378-387.
  77. **Kulis, M. and M. Esteller.** 2010. DNA Methylation and Cancer. *Advances in Genetics* **70**:27-56.
  78. **Laffer, U. T. and U. Metzger.** 1995. Intraportal chemotherapy for colorectal hepatic metastases. *World J Surg.* **19**:246-251.
  79. **Latham, K. E.** 1996. X chromosome imprinting and inactivation in the early mammalian embryo. *Trends Genet.* **12**:134-138.
  80. **Le, X. F., Y. Groner, S. M. Kornblau, Y. Gu, W. N. Hittelman, D. Levanon, K. Mehta, R. B. Arlinghaus, and K. S. Chang.** 1999. Regulation of AML2/CBFA3 in hematopoietic cells through the retinoic acid receptor alpha-dependent signaling pathway. *J Biol. Chem.* **274**:21651-21658.
  81. **Lee, Y. M.** 2011. Control of RUNX3 by histone methyltransferases. *J Cell Biochem.* **112**:394-400.
  82. **Lengauer, C., K. W. Kinzler, and B. Vogelstein.** 1997. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**:623-627.
  83. **Levanon, D., V. Negreanu, Y. Bernstein, I. Bar-Am, L. Avivi, and Y. Groner.** 1994. AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics* **23**:425-432.
  84. **Li, Q. L., K. Ito, C. Sakakura, H. Fukamachi, K. Inoue, X. Z. Chi, K. Y. Lee, S. Nomura, C. W. Lee, S. B. Han, H. M. Kim, W. J. Kim, H.**



- Yamamoto, N. Yamashita, T. Yano, T. Ikeda, S. Itohara, J. Inazawa, T. Abe, A. Hagiwara, H. Yamagishi, A. Ooe, A. Kaneda, T. Sugimura, T. Ushijima, S. C. Bae, and Y. Ito.** 2002. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* **109**:113-124.
85. **Li, W. Q., K. Kawakami, A. Ruskiewicz, G. Bennett, J. Moore, and B. Iacopetta.** 2006. BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol. Cancer* **5**:2.
86. **Liang, J. T., K. C. Huang, H. S. Lai, P. H. Lee, Y. M. Cheng, H. C. Hsu, A. L. Cheng, C. H. Hsu, K. H. Yeh, S. M. Wang, C. Tang, and K. J. Chang.** 2002. High-frequency microsatellite instability predicts better chemosensitivity to high-dose 5-fluorouracil plus leucovorin chemotherapy for stage IV sporadic colorectal cancer after palliative bowel resection. *Int. J. Cancer* **101**:519-525.
87. **Longo, W. E. and F. E. Johnson.** 2002. The preoperative assessment and postoperative surveillance of patients with colon and rectal cancer. *Surg. Clin. North Am.* **82**:1091-1108.
88. **Lukas, J., D. Parry, L. Aagaard, D. J. Mann, J. Bartkova, M. Strauss, G. Peters, and J. Bartek.** 1995. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* **375**:503-506.
89. **Lynch, H. T., W. Kimberling, W. A. Albano, J. F. Lynch, K. Biscione, G. S. Schuelke, A. A. Sandberg, M. Lipkin, E. E. Deschner, Y. B. Mikol, and .** 1985. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). I. Clinical description of resource. *Cancer* **56**:934-938.
90. **Lynch, H. T., S. J. Lanspa, B. M. Boman, T. Smyrk, P. Watson, J. F. Lynch, P. M. Lynch, G. Cristofaro, P. Bufo, A. V. Tauro, and .** 1988. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer--Lynch syndromes I and II. *Gastroenterol Clin. North Am.* **17**:679-712.
91. **Lynch, H. T., S. J. Lemon, B. Karr, B. Franklin, J. F. Lynch, P. Watson, S. Tinley, C. Lerman, and C. Carter.** 1997. Etiology, natural history, management and molecular genetics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes): genetic counseling implications. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **6**:987-991.
92. **Malhotra, P., R. Kochhar, K. Vaiphei, J. Wig, and S. Mahmood.** 2010. Aberrant promoter methylation of p16 in colorectal adenocarcinoma in North Indian patients. *World J Gastrointest Oncol* **2**(7):295-303.
93. **Marchesa, P., B. A. Lashner, I. C. Lavery, J. Milsom, T. L. Hull, S. A. Strong, J. M. Church, G. Navarro, and V. W. Fazio.** 1997. The risk of cancer and dysplasia among ulcerative colitis patients with primary sclerosing cholangitis. *Am. J Gastroenterol* **92**:1285-1288.
94. **Minsky, B. and C. Mies.** 1989. The clinical significance of vascular invasion in colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* **32**:794-803.

95. **Moertel, C. G., T. R. Fleming, J. S. Macdonald, D. G. Haller, J. A. Laurie, C. M. Tangen, J. S. Ungerleider, W. A. Emerson, D. C. Tormey, J. H. Glick, M. H. Veeder, and J. A. Mailliard.** 1995. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann. Intern. Med.* **122**:321-326.
96. **Myohanen, S. K., S. B. Baylin, and J. G. Herman.** 1998. Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res.* **58**:591-593.
97. National Cancer Institute. Surveillance Epidemiology and End Results 2001-2007. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2008/sections.html](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/sections.html) . 2008. 14-3-2012.  
Ref Type: Electronic Citation
98. **Niv, Y.** 2005. Biologic behavior of microsatellite-unstable colorectal cancer and treatment with 5-fluorouracil. *Isr. Med. Assoc. J.* **7**:520-524.
99. **Normanno, N., S. Tejpar, F. Morgillo, L. A. De, C. E. Van, and F. Ciardiello.** 2009. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat. Rev. Clin. Oncol* **6**:519-527.
100. **Ogino, S., M. Brahmandam, T. Kawasaki, G. J. Kirkner, M. Loda, and C. S. Fuchs.** 2006. Combined analysis of COX-2 and p53 expressions reveals synergistic inverse correlations with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Neoplasia.* **8**:458-464.
101. **Ogino, S., M. Cantor, T. Kawasaki, M. Brahmandam, G. J. Kirkner, D. J. Weisenberger, M. Campan, P. W. Laird, M. Loda, and C. S. Fuchs.** 2006. CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut* **55**:1000-1006.
102. **Ogino, S. and A. Goel.** 2008. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J. Mol. Diagn.* **10**:13-27.
103. **Ogino, S., T. Kawasaki, M. Brahmandam, M. Cantor, G. J. Kirkner, D. Spiegelman, G. M. Makrigiorgos, D. J. Weisenberger, P. W. Laird, M. Loda, and C. S. Fuchs.** 2006. Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J. Mol. Diagn.* **8**:209-217.
104. **Ogino, S., T. Kawasaki, G. J. Kirkner, P. Kraft, M. Loda, and C. S. Fuchs.** 2007. Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J. Mol. Diagn.* **9**:305-314.
105. **Ogino, S., T. Kawasaki, G. J. Kirkner, M. Loda, and C. S. Fuchs.** 2006. CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer: possible associations with male sex and KRAS mutations. *J. Mol. Diagn.* **8**:582-588.

106. **Ogino, S., J. A. Meyerhardt, T. Kawasaki, J. W. Clark, D. P. Ryan, M. H. Kulke, P. C. Enzinger, B. M. Wolpin, M. Loda, and C. S. Fuchs.** 2007. CpG island methylation, response to combination chemotherapy, and patient survival in advanced microsatellite stable colorectal carcinoma. *Virchows Arch.* **450**:529-537.
107. **Ogino, S., R. D. Odze, T. Kawasaki, M. Brahmandam, G. J. Kirkner, P. W. Laird, M. Loda, and C. S. Fuchs.** 2006. Correlation of pathologic features with CpG island methylator phenotype (CIMP) by quantitative DNA methylation analysis in colorectal carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **30**:1175-1183.
108. **Ojugo, A. S., P. M. McSheehy, M. Stubbs, G. Alder, C. L. Bashford, R. J. Maxwell, M. O. Leach, I. R. Judson, and J. R. Griffiths.** 1998. Influence of pH on the uptake of 5-fluorouracil into isolated tumour cells. *Br. J Cancer* **77**:873-879.
109. **Oken, M. M., R. H. Creech, D. C. Tormey, J. Horton, T. E. Davis, E. T. McFadden, and P. P. Carbone.** 1982. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am. J Clin. Oncol* **5**:649-655.
110. **Oliveira, C., J. L. Westra, D. Arango, M. Ollikainen, E. Domingo, A. Ferreira, S. Velho, R. Niessen, K. Lagerstedt, P. Alhopuro, P. Laiho, I. Veiga, M. R. Teixeira, M. Ligtenberg, J. H. Kleibeuker, R. H. Sijmons, J. T. Plukker, K. Imai, P. Lage, R. Hamelin, C. Albuquerque, Schwartz S Jr, A. Lindblom, P. Peltomaki, H. Yamamoto, L. A. Aaltonen, R. Seruca, and R. M. Hofstra.** 2004. Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Hum. Mol. Genet.* **13**:2303-2311.
111. **Oostendorp, L. J., P. F. Stalmeier, P. C. Pasker-de Jong, W. T. Van der Graaf, and P. B. Ottevanger.** 2010. Systematic review of benefits and risks of second-line irinotecan monotherapy for advanced colorectal cancer. *Anticancer Drugs* **21**:749-758.
112. **Owens, W. D., J. A. Felts, and E. L. Spitznagel, Jr.** 1978. ASA physical status classifications: a study of consistency of ratings. *Anesthesiology* **49**:239-243.
113. **Persson, P. G., P. Karlen, O. Bernell, C. E. Leijonmarck, O. Brostrom, A. Ahlbom, and G. Hellers.** 1994. Crohn's disease and cancer: a population-based cohort study. *Gastroenterology* **107**:1675-1679.
114. **Poon, M. A., M. J. O'Connell, C. G. Moertel, H. S. Wieand, S. A. Cullinan, L. K. Everson, J. E. Krook, J. A. Mailliard, J. A. Laurie, L. K. Tschetter, and .** 1989. Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin. Oncol* **7**:1407-1418.
115. **Puig-Kroger, A. and A. Corbi.** 2006. RUNX3: a new player in myeloid gene expression and immune response. *J Cell Biochem.* **98**:744-756.

116. **Ramsahoye, B. H., D. Biniszkiewicz, F. Lyko, V. Clark, A. P. Bird, and R. Jaenisch.** 2000. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:5237-5242.
117. **Ressing, M. and K. Emrich.** 2012. Krebs in Rheinland-Pfalz - Überlebenszeiten von Darm-, Brust- und Prostatakrebs. *Ärztebl. RLP* **65** (3):20-23.
118. **Rice, J. C. and C. D. Allis.** 2001. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:263-273.
119. **Riihonen, R., C. T. Supuran, S. Parkkila, S. Pastorekova, H. K. Vaananen, and T. Laitala-Leinonen.** 2007. Membrane-bound carbonic anhydrases in osteoclasts. *Bone* **40**:1021-1031.
120. Robert Koch Institut. **Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends.**  
[http://www.rki.de/cln\\_160/nn\\_204124/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/KID/kid\\_node.html?\\_nnn=true](http://www.rki.de/cln_160/nn_204124/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/KID/kid_node.html?_nnn=true) . 23-2-2010. 6-6-2010.  
Ref Type: Electronic Citation
121. **Rothenberg, M. L.** 2004. Current status of second-line therapy for metastatic colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **4 Suppl 1**:S16-S21.
122. **Rustum, Y. M., F. Trave, S. F. Zakrzewski, N. Petrelli, L. Herrera, A. Mittelman, S. G. Arbuck, and P. J. Creaven.** 1987. Biochemical and pharmacologic basis for potentiation of 5-fluorouracil action by leucovorin. *NCI. Monogr* 165-170.
123. **Sakai, T., J. Toguchida, N. Ohtani, D. W. Yandell, J. M. Rapaport, and T. P. Dryja.** 1991. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am. J Hum. Genet.* **48**:880-888.
124. **Saltzman, A. K., J. R. Carter, J. M. Fowler, J. W. Carlson, E. M. Hartenbach, S. E. Julian, L. F. Carson, and L. B. Twiggs.** 1995. The utility of preoperative screening colonoscopy in gynecologic oncology. *Gynecol. Oncol* **56**:181-186.
125. **Samowitz, W. S., H. Albertsen, J. Herrick, T. R. Levin, C. Sweeney, M. A. Murtaugh, R. K. Wolff, and M. L. Slattery.** 2005. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* **129**:837-845.
126. **Schmiegel, W. e. a.** 2008. S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom" – Aktualisierung 2008 Ergebnis einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz (8.–9. Juni 2007), abstr. *Z Gastroenterol* **2008;46**: 799-840.
127. **Schumpelick, V.** 2006. Kolon und Rektum, p. 506-542. *In V.* Schumpelick, N. Bleese, and U. Mommsen (ed.), *Kurzlehrbuch Chirurgie*. Thieme, Stuttgart.

128. **Serrano, M., G. J. Hannon, and D. Beach.** 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**:704-707.
129. **Shen, L. and J. P. Issa.** 2002. Epigenetics in colorectal cancer. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **18**:68-73.
130. **Shen, L., M. Toyota, Y. Kondo, E. Lin, L. Zhang, Y. Guo, N. S. Hernandez, X. Chen, S. Ahmed, K. Konishi, S. R. Hamilton, and J. P. Issa.** 2007. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:18654-18659.
131. **Siegenthaler, W. and H. Blum.** 2006. *Klinische Pathophysiologie.* Thieme, Stuttgart.
132. **Sorbye, H., A. Berglund, K. M. Tveit, D. Ogreid, E. H. Wanderas, T. Wentzel-Larsen, O. Dahl, and B. Glimelius.** 2007. Secondary treatment and predictive factors for second-line chemotherapy after first-line oxaliplatin-based therapy in metastatic colorectal cancer. *Acta Oncol* **46**:982-988.
133. **Stams, T., Y. Chen, P. A. Boriack-Sjodin, J. D. Hurt, J. Liao, J. A. May, T. Dean, P. Laipis, D. N. Silverman, and D. W. Christianson.** 1998. Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide: molecular basis of isozyme-drug discrimination. *Protein Sci.* **7**:556-563.
134. **Stams, T., S. K. Nair, T. Okuyama, A. Waheed, W. S. Sly, and D. W. Christianson.** 1996. Crystal structure of the secretory form of membrane-associated human carbonic anhydrase IV at 2.8-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:13589-13594.
135. **Stone, S., P. Jiang, P. Dayananth, S. V. Tavtigian, H. Katcher, D. Parry, G. Peters, and A. Kamb.** 1995. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res.* **55**:2988-2994.
136. **Toyota, M., N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, J. G. Herman, S. B. Baylin, and J. P. Issa.** 1999. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:8681-8686.
137. **Toyota, M., M. Ohe-Toyota, N. Ahuja, and J. P. Issa.** 2000. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:710-715.
138. Tumorregister München. Überleben C18-C20:Darmtumor. [www.tumorregister-muenchen.de](http://www.tumorregister-muenchen.de) . 29-6-2011. 14-3-2012.  
Ref Type: Electronic Citation
139. **Umar, A., C. R. Boland, J. P. Terdiman, S. Syngal, C. A. de la, J. Ruschoff, R. Fishel, N. M. Lindor, L. J. Burgart, R. Hamelin, S. R. Hamilton, R. A. Hiatt, J. Jass, A. Lindblom, H. T. Lynch, P. Peltomaki, S. D. Ramsey, M. A. Rodriguez-Bigas, H. F. Vasen, E. T.**

- Hawk, J. C. Barrett, A. N. Freedman, and S. Srivastava.** 2004. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl. Cancer Inst.* **96**:261-268.
140. **van, R. M., H. Elsaleh, D. Joseph, K. McCaul, and B. Iacopetta.** 2003. CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **9**:2898-2903.
141. **Van, R. M., F. Grieu, H. Elsaleh, D. Joseph, and B. Iacopetta.** 2002. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut* **51**:797-802.
142. **Vasen, H. F., J. P. Mecklin, P. Watson, J. Utsunomiya, L. Bertario, P. Lynch, L. B. Svendsen, G. Cristofaro, H. Muller, P. M. Khan, and .** 1993. Surveillance in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an international cooperative study of 165 families. The International Collaborative Group on HNPCC. *Dis. Colon Rectum* **36**:1-4.
143. **Vasen, H. F., P. Watson, J. P. Mecklin, and H. T. Lynch.** 1999. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* **116**:1453-1456.
144. **Watson, P. and H. T. Lynch.** 1994. The tumor spectrum in HNPCC. *Anticancer Res.* **14**:1635-1639.
145. **Weisenberger, D. J., K. D. Siegmund, M. Campan, J. Young, T. I. Long, M. A. Faasse, G. H. Kang, M. Widschwendter, D. Weener, D. Buchanan, H. Koh, L. Simms, M. Barker, B. Leggett, J. Levine, M. Kim, A. J. French, S. N. Thibodeau, J. Jass, R. Haile, and P. W. Laird.** 2006. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* **38**:787-793.
146. **Yagi, K., K. Akagi, H. Hayashi, G. Nagae, S. Tsuji, T. Isagawa, Y. Midorikawa, Y. Nishimura, H. Sakamoto, Y. Seto, H. Aburatani, and A. Kaneda.** 2010. Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**:21-33.
147. **Zhu, X. L. and W. S. Sly.** 1990. Carbonic anhydrase IV from human lung. Purification, characterization, and comparison with membrane carbonic anhydrase from human kidney. *J Biol. Chem.* **265**:8795-8801.
148. **Zlobec, I., M. Bihl, A. Foerster, A. Ruffe, and A. Lugli.** 2011. Comprehensive analysis of CpG island methylator phenotype (CIMP)-high, -low, and -negative colorectal cancers based on protein marker expression and molecular features. *J Pathol.* **225**:336-343.

# Anhang

## 1. LC-Protokoll für RUNX3

### LightCycler Quantification Report

User: Ben

LightCycler ID: 192

Filename: C:\LightCycler3\Users\Simone\Data\RUNX3\RUNX3 Nr. 4; 22.02.2008.ABT

LC Run Version: 5.32

LCDA Version: 3.5.28

This experiment was run on Feb 22, 2008 by zmd.

#### Experimental Protocol

Program:	Denat				Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	900	20	0	0	0	None	

Program:	Ampl TD				Type:	None	Cycles:	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	15	20	0	0	0	None	
2	68	20	20	65	0.2	2	Single	

Program:	Melt				Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	10	20	0	0	0	None	
2	55	0	20	0	0	0	None	
3	65	0	0.5	0	0	0	None	
4	99	0	0.15	0	0	0	Continuous	
5	45	20	20	0	0	0	None	

#### Fluorescence Settings

LED Power	CALIB	Display Mode	3.5 Compatible
Color	N/A		
Compensation	N/A		
Car. Movement	Continuous		

#### Quantification Settings

Channel Setting	F1		
Program Name	Ampl TD		
Start Time	0:16:01.4	Stop Time	0:55:56.3
Analysis	2nd Der Max	No. of Points	N/A
Baseline Adjust.	Arithmetic		
Noise Band	0.0220		
Crossing Line		Position	N/A
Slope	0.000		
Intercept	0.000		
r	0.00		
Error	0.000		

## 2. LC-Protokoll für SOCS1

### LightCycler Quantification Report

User: Ben

LightCycler ID: 192

Filename: C:\LightCycler3\Users\Simone\Data\SOCS1\SOCS1 Nr.13; 27.02.2008.ABT

LC Run Version: 5.32

LCDA Version: 3.5.28

This experiment was run on Feb 27, 2008 by simone.

#### Experimental Protocol

Program:	Denat				Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	900	20	0	0	0	None	

Program:	2 Step Ampl				Type:	None	Cycles:	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	10	20	0	0	0	None	
2	68	20	20	0	0	0	Single	

Program:	Melt				Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	2	20	0	0	0	None	
2	60	6	20	0	0	0	None	
3	98	0	0.15	0	0	0	Continuous	
4	45	20	20	0	0	0	None	

#### Fluorescence Settings

LED Power	CALIB	Display Mode	3.5 Compatible
Color	N/A		
Compensation	N/A		
Car. Movement	Continuous		

#### Quantification Settings

Channel Setting	F1		
Program Name	2 Step Ampl		
Start Time	0:15:55.4	Stop Time	0:50:30.1
Analysis	2nd Der Max	No. of Points	N/A
Baseline Adjust.	Arithmetic		
Noise Band	0.0404		
Crossing Line		Position	N/A
Slope	0.000		
Intercept	0.000		
r	0.00		
Error	0.000		



### 3. LC-Protokoll für p16

LightCycler Quantification Report										
User: Ben			LightCycler ID: 192							
Filename: C:\LightCycler3\Users\Simone\Data\P16 Nr.31; 12.04.2008.ABT										
LC Run Version: 5.32			LCDA Version: 3.5.28							
This experiment was run on Apr 12, 2008 by simone.										
Fluorescence Settings					Quantification Settings					
LED Power	CALIB	Display Mode	3.5 Compatible		Channel Setting	F1				
Color	N/A				Program Name	Ampl				
Compensation	N/A				Start Time	0:16:10.1	Stop Time	1:00:20.55		
Car. Movement	Continuous				Analysis	2nd Der Max	No. of Points	N/A		
					Baseline Adjust	Arithmetic				
					Noise Band	0.0114				
					Crossing Line	Position				
					Slope	0.000				
					Intercept	0.000				
					r	0.00				
					Error	0.000				

LightCycler Quantification Report

User: Ben

LightCycler ID: 192

Filename: C:\LightCycler3\Users\Simone\Data\P16 Nr.31; 12.04.2008.ABT

LC Run Version: 5.32

LCDA Version: 3.2.28

This experiment was run on Apr 12, 2008 by simone.

Experimental Protocol

Program:		Densit		Type:	None	Step Size	Step Delay	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp (°C)		(°C)	(Cycles)		Acquisition Mode
1	94	900	20	0		0	0		None

Program:		Ampl		Type:	None	Step Size	Step Delay	Cycles:	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp (°C)		(°C)	(Cycles)		Acquisition Mode
1	94	10	20	0		0	0		None
2	60	17	20	0		0	0		None
3	72	7	20	0		0	0		None
4	80	1	4	0		0	0		Single

Program:		melt		Type:	None	Step Size	Step Delay	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp (°C)		(°C)	(Cycles)		Acquisition Mode
1	95	0	20	0		0	0		None
2	60	15	20	0		0	0		None
3	95	0	0.15	0		0	0		Continuous

Program:		cool		Type:	None	Step Size	Step Delay	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp (°C)		(°C)	(Cycles)		Acquisition Mode
1	45	20	20	0		0	0		None

#### 4. LC-Protokoll für CA4

### LightCycler Quantification Report

User: Ben

LightCycler ID: 192

Filename: C:\LightCycler3\Users\Simone\Data\CA4 Nr. 10; 18.10.2007.ABT

LC Run Version: 5.32

LCDA Version: 3.5.28

This experiment was run on Oct 18, 2007 by simone.

#### Experimental Protocol

Program:	15 min Denat				Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	94	900	20	0	0	0	None	

Program:	Amplification				Type:	Quantification	Cycles:	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	10	20	0	0	0	None	
2	62	17	20	0	0	0	None	
3	72	6	3	0	0	0	Single	

Program:	Melt				Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	5	20	0	0	0	None	
2	60	10	20	0	0	0	None	
3	99	0	0.2	0	0	0	Continuous	
4	45	20	20	0	0	0	None	

#### Fluorescence Settings

LED Power	CALIB	Display Mode	3.5 Compatible
Color	N/A		
Compensation	N/A		
Car. Movement	Continuous		

#### Quantification Settings

Channel Setting	F1		
Program Name	Amplification		
Start Time	0:16:06.8	Stop Time	0:57:40.8
Analysis	2nd Der Max	No. of Points	N/A
Baseline Adjust.	Arithmetic		
Noise Band	0.0148		
Crossing Line		Position	N/A
Slope	0.000		
Intercept	0.000		
r	0.00		
Error	0.000		

**5. Methylierungswerte von CA4 in Prozent**

Nr.	CA4 (%)	Nr.	CA4 (%)	Nr.	CA4 (%)	Nr.	CA4 (%)
1	57	38	14	75	5	112	42
2	1	39	12	76	8	113	3
3	38	40	3	77	13	114	10
4	2	41	7	78	17	115	4
5	3	42	3	79	38	116	44
6	9	43	13	80	3	117	2
7	2	44	31	81	7	118	7
8	60	45	6	82	38	119	17
9	4	46	26	83	0	120	3
10	1	47	34	84	2	121	0
11	41	48	8	85	32	122	2
12	19	49	10	86	5	123	4
13	3	50	5	87	55	124	13
14	0	51	55	88	3	125	6
15	24	52	29	89	12	126	2
16	39	53	5	90	4	127	8
17	14	54	31	91	11	128	1
18	51	55	18	92	4	129	8
19	52	56	23	93	68	130	19
20	31	57	7	94	1	131	36
21	39	58	3	95	7	132	12
22	6	59	20	96	45	133	5
23	15	60	9	97	5	134	20
24	21	61	2	98	45	135	16
25	16	62	16	99	73	136	3
26	26	63	13	100	7	137	12
27	2	64	3	101	12	138	3
28	3	65	3	102	45	139	34
29	24	66	2	103	49	140	2
30	2	67	8	104	29	141	25

<b>31</b>	42	<b>68</b>	60	<b>105</b>	1	<b>142</b>	16
<b>32</b>	3	<b>69</b>	0	<b>106</b>	46	<b>143</b>	50
<b>33</b>	52	<b>70</b>	1	<b>107</b>	2	<b>144</b>	30
<b>34</b>	3	<b>71</b>	1	<b>108</b>	50	<b>145</b>	5
<b>35</b>	23	<b>72</b>	11	<b>109</b>	7	<b>146</b>	9
<b>36</b>	39	<b>73</b>	51	<b>110</b>	0	<b>147</b>	4
<b>37</b>	72	<b>74</b>	21	<b>111</b>	8	<b>148</b>	68

## 6. Methylierungswerte von p16, SOCS1 und RUNX3 in Prozent

Nr.	p16 (%)	SOCS1 (%)	RUNX3 (%)	Nr.	p16 (%)	SOCS1 (%)	RUNX3 (%)	Nr.	p16 (%)	SOCS1 (%)	RUNX3 (%)
<b>1</b>	46	41	63	<b>51</b>	2	23	0	<b>101</b>	3	0	0
<b>2</b>	3	0	34	<b>52</b>	3	1	0	<b>102</b>	6	0	0
<b>3</b>	5	0	0	<b>53</b>	3	0	0	<b>103</b>	3	27	26
<b>4</b>	2	1	0	<b>54</b>	8	0	0	<b>104</b>	7	0	0
<b>5</b>	44	0	0	<b>55</b>	21	0	0	<b>105</b>	2	0	0
<b>6</b>	3	1	0	<b>56</b>	4	3	0	<b>106</b>	22	27	17
<b>7</b>	4	0	0	<b>57</b>	5	2	0	<b>107</b>	2	0	0
<b>8</b>	7	0	0	<b>58</b>	40	1	0	<b>108</b>	39	0	38
<b>9</b>	4	0	0	<b>59</b>	6	0	0	<b>109</b>	3	0	0
<b>10</b>	70	0	0	<b>60</b>	32	0	0	<b>110</b>	94	0	0
<b>11</b>	62	0	26	<b>61</b>	8	0	0	<b>111</b>	3	0	0
<b>12</b>	5	0	0	<b>62</b>	4	0	0	<b>112</b>	52	0	0
<b>13</b>	2	0	0	<b>63</b>	1	0	0	<b>113</b>	3	0	0
<b>14</b>	3	53	0	<b>64</b>	5	0	11	<b>114</b>	19	37	28
<b>15</b>	75	0	0	<b>65</b>	3	0	0	<b>115</b>	8	0	0
<b>16</b>	3	1	0	<b>66</b>	3	1	0	<b>116</b>	3	0	0
<b>17</b>	3	1	0	<b>67</b>	4	0	0	<b>117</b>	4	0	0
<b>18</b>	4	1	0	<b>68</b>	48	27	54	<b>118</b>	5	0	0
<b>19</b>	2	0	0	<b>69</b>	6	0	0	<b>119</b>	2	0	0
<b>20</b>	2	0	21	<b>70</b>	9	0	0	<b>120</b>	2	0	0
<b>21</b>	42	0	42	<b>71</b>	20	1	0	<b>121</b>	6	0	0

22	3	0	0	72	2	3	0	122	1	0	0
23	4	0	0	73	34	33	21	123	6	0	0
24	2	1	0	74	2	0	0	124	4	0	0
25	5	0	0	75	3	0	0	125	3	1	0
26	4	13	0	76	5	0	0	126	3	0	0
27	1	1	0	77	3	0	0	127	2	0	0
28	5	0	0	78	25	0	33	128	3	0	0
29	5	1	0	79	10	0	5	129	5	1	0
30	2	0	0	80	3	0	0	130	63	0	0
31	5	35	0	81	3	0	0	131	17	24	26
32	1	0	0	82	0	0	0	132	39	0	0
33	37	26	39	83	4	0	0	133	2	0	0
34	6	0	0	84	8	0	0	134	2	0	0
35	13	16	8	85	3	0	26	135	7	0	0
36	40	0	0	86	4	4	0	136	4	0	0
37	64	0	52	87	4	0	0	137	2	0	0
38	2	0	0	88	2	0	0	138	2	0	0
39	3	0	0	89	2	0	0	139	1	0	0
40	2	0	0	90	2	0	0	140	18	0	0
41	3	0	0	91	10	14	10	141	2	0	0
42	16	0	2	92	4	0	0	142	3	0	0
43	1	1	0	93	24	0	0	143	42	41	46
44	38	0	21	94	3	0	0	144	38	34	0
45	22	0	0	95	16	0	0	145	3	0	0
46	15	0	18	96	21	0	19	146	2	0	0
47	3	0	0	97	1	0	0	147	3	0	0
48	3	0	0	98	4	16	37	148	27	31	51
49	3	0	0	99	36	0	19				
50	6	0	3	100	4	0	0				

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hofstädter für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Pathologie in Regensburg anfertigen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Dietmaier für die Überlassung des Dissertationsthemas, sowie die stete und geduldige Unterstützung und Betreuung.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Marcus Bettstetter für die exzellente Betreuung der experimentellen Arbeiten bedanken. Vielen Dank für ein immer offenes Ohr und das unermüdliche Suchen nach Lösungen von Problemen.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg für die freundliche Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken. Ein besonderes Dankeschön gilt an dieser Stelle Stefanie Götz und Kerstin Meier für die stets vorhandene Hilfsbereitschaft. Bei Felix Steger bedanke ich mich für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Beim Tumorzentrum Regensburg bedanke ich mich für die Bereitstellung vieler klinischer Daten.

Ein besonderer Dank gilt meiner Schwiegermutter Anna für das Korrekturlesen. Außerdem ein herzliches Dankeschön an meine Eltern, welche mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen. Auch bei meinem Ehemann Andreas möchte ich mich für die Hilfe beim Layout bedanken und dafür, dass er immer hinter mir steht. Vielen Dank an meine ganze Familie, dass sie mich immer unterstützt und ermutigt hat.

## Erklärung

„Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt“.

Regensburg, den

---

Simone Schuster